Vol. 13 N. 2

CARYOLOGIA

Giornale di Citologia, Citosistematica e Genetica
Journal of Cytology, Cytosystematics and Genetics

Fondato
da
ALBERTO CHIARUGI

Editore e Direttore:
EMILIA MESSERI CHIARUGI

Condirettore resp. e Redattore:
FERNANDO FABBRI

Comitato di consulenza scientifica:
EMILIO BATTAGLIA
MARIO BENAZZI
VINCENZO CHIARUGI
GIUSEPPE COLOSI
ROBERTO CORTI
FRANCESCO D'AMATO
ELEONORA FRANCINI CORTI
GIUSEPPE MARTINOLI
ALBINA MESSERI
EMANUELE PADOA
RODOLFO PICHI-SERMOLLI

FIRENZE
INDUSTRIA TIPOGRAFICA FIORENTINA
1960

CARYOLOGIA

NORME PER I COLLABORATORI

CARYOLOGIA è un periodico dedicato alla pubblicazione di ricerche origi nali di citologia, di citosistematica e di genetica su piante e animali. Ogni Volum viene pubblicato annualmente suddiviso in tre fascicoli e comprende circa 450-50 pagine (*Prezzo di abbonamento per tutti i paesi: Lit. 4800 al Volume*).

Le memorie, gli abbonamenti e la corrispondenza relativa devono es sere inviate al seguente indirizzo: Dr. Fernando Fabbri, Redazione di "Ca ryologia", Via Lamarmora, 4 - Firenze.

MANOSCRITTI - Le memorie possono essere redatte in italiano, in francese o in inglese. Devono essere presentate nella forma definitiva e dattiloscritte. Il nom degli Autori citati nel testo deve essere scritto tutto con lettere maiuscole e deve es sere seguito, fra parentesi, dall'anno in cui il lavoro citato è stato pubblicato. L successione delle varie parti della memoria deve seguire quest'ordine: testo del memoria, bibliografia, spiegazione delle eventuali tavole fuori testo, « summary » riassunto; in un foglio a parte deve essere scritta la spiegazione delle eventua figure nel testo. La bibliografia, elencata sotto forma di lista in ordine alfabetico deve essere compilata attenendosi *strettamente* ai seguenti esempi:

BRACHET J., 1957. — Biochemical cytology. Academi Press, New York.

CHIARUGI A., 1933a. — La cariologia e le sue appli- cazioni a problemi di botanica. Atti Soc. Ital Progr. Sci., 3: 55-92.

—, 1933b. — Osservazioni cariologiche e sistema- tiche sui generi Kernera e Rhizobotrya (Cruci- ferae-Thlaspidinae). Nuovo Giorn. Bot. Ital. n. s., 40: 63-75.

BOZZE DI STAMPA - L'Autore ha diritto alla correzione delle prime bozze durante tale correzione potrà apportare al testo solo lievi modifiche. A giud zio della Redazione possono essere inviate all'A. anche le seconde bozze; durant questa correzione però l'A. dovrà limitarsi a correggere i refusi di stampa e no dovrà apportare modifiche al testo. Tutte le altre correzioni vengono eseguite cura della Redazione.

ILLUSTRAZIONI - Le memorie possono essere corredate da figure nel te sto e da tavole fuori testo. Le fotografie destinate alle tavole fuori testo, stampat su carta bianco-lucida e smaltate, devono essere incollate con la maggiore precision possibile su un cartoncino, in modo da ottenere un rettangolo di 12 × 18 cm., lato maggiore verticale. Solo eccezionalmente si potranno superare di poco dett misure. Tutte le fotografie di ogni tavola devono essere provviste di un numer progressivo, posto nell'angolo inferiore destro di ogni fotografia.

ESTRATTI - Gli Autori ricevono gratuitamente 50 estratti senza copertina Possono ottenerne un numero superiore a pagamento: in tal caso dovranno indicarn nelle bozze il numero desiderato, e se essi devono essere con o senza copertina.

Gli Autori sono responsabili per il contenuto e lo stile delle loro memorie.

CYTO-HISTOLOGICAL INVESTIGATIONS OF ANTIMITOTIC SUBSTANCES AND THEIR EFFECTS ON PATTERNS OF DIFFERENTIATION *

by

FRANCESCO D'AMATO

Istituto di Genetica dell'Università, Pisa, Italy.

Received: 26th March 1960.

Somatic cell variation is the outcome of the process of differentiation. The problem of how cellular diversity might be established, starting from cells possessing an apparently identical endowment of nuclear material is still unsolved. In the present Report, I will not be directly concerned with such a problem, but rather I will attempt an analysis of some sources of somatic cell variation as resulting from experimental and natural actions on mitosis and in relation to the ensuing patterns of differentiation.

Considering mitosis, we can easily subdivide the division process in a plant cell into the following three essential steps:

1) the «preprophase», the stage during which gene reproduction accompanied by doubling of the chromosome thread takes place;

2) the organization and function of the mitotic spindle;

3) the cytokinesis, due to phragmoplast formation between the two daughter nuclei at telophase.

The investigations carried out in the last twenty years or so have shown that substances exist which are able to inhibit electively one of the aforesaid mitotic steps. I have, therefore, proposed a schematic classification of the mitotic poisons into the three categories of: *a*) preprophase inhibitors (mitostatic agents); *b*) spindle inhibitors (typical C-mitotic agents) and *c*) cytokinesis inhibitors (D'AMATO 1948, 1950, 1954*a*). As already pointed out, mitotic poisons ascribed to one of the three categories might also induce cytological reactions comparable to those

* This is the text of an invited lecture presented before the IX International Botanical Congress in Montreal, Canada, August 19-29, 1959.

observed with agents of the remaining two categories, depending on dos and/or duration of exposure. However, a detailed study of a wide rang of concentrations and durations of exposure, combined with a considera tion of the relative position of the thresholds of the different cytologica reactions, will in most, if not all, cases avoid confusion in classification.

Also mutagenic chemicals, inducing gene and/or structural change in chromosomes, can be grouped into the three categories proposed, o account of their effect on mitosis (cf. D'AMATO 1954*a*, 1958). Howeve important mutagenic actions might be, they fall out of the limits of m present Report.

I. PREPROPHASE INHIBITION

Preprophase inhibition, manifesting itself with the inability of in terphase nuclei to enter mitosis, may be brought about by an interfer ence with the energetic and/or synthetic processes taking place at pre prophase (BULLOUGH's «antephase», 1952). In this respect, a grea diversity of initial points of attack by preprophase poisons can be conceiv ed, in connection with the various aspects of carbohydrate metabolism nucleic acid metabolism or protein metabolism characterizing prepara tion for mitosis in the cell (cf. BULLOUGH 1952; SWANN 1957-1958 BIESELE 1958). With some preprophase poisons (DEYSSON's «substance mitostatiques à l'état pur», cf. 1954), the only cytological effect is inhi bition of interphase nuclei to enter mitosis, the strenght of the concen tration used being of no consequence. Thus, in case of treatment of a meristem, all mitoses present at the beginning of the treatment wil reach telophase completely undisturbed. This situation, also observed in dividing animal materials (cf. BIESELE 1958), clearly demonstrates that, if a cell has entered mitosis before undergoing the action of some preprophase poisons, it will be able to complete division.

A «pure» preprophase effect, as reported above, can also be induced by threshold concentrations of many other preprophase poisons; with these, however, a progressive increase in concentration will also affect other mitotic stages, bringing about-either in succession or at the same time, according to the substance-: *a*) prophase prolongation («prophase poisoning») and *b*) spindle inhibition (for more details, cf. D'AMATO 1950, 1954*a*). Excluding lethal actions, treatment of dividing tissues with a preprophase poison will result in a mitosis-free condition, either reversible or irreversible depending on type of substance, dose and durat-

ion of exposure. The question now arises: what are the histological consequences of an experimentally induced mitosis inhibition in a meristem? There is plenty of evidence that, in both the shoot and the root apex in Phanerogams, irreversible mitostasis results in a parenchymatization of the meristems, followed by other maturation processes; mainly, vascular differentiation in extension of the vascular system of the organ (cf. D'AMATO and AVANZI 1948; GIFFORD 1956; GREULACH and ATCHISON 1953; MACKIE, BLUME and HAGEN 1952; POLLOCK, GOODWIN and GREENE 1954). Also in the apex of a fern, *Dryopteris austriaca*, a treatment with thiamine hydrochloride or yeast extract changes the meristem into a parenchymatous tissue, whilst scales are developed all over the meristem. In addition, buds, which never occur on the intact apical meristem, are sometimes formed on these apices (WARDLAW 1955). In this context, the interesting observations made by DELAY (1958) in the alga *Chara vulgaris* are worth being mentioned. With some colchicine treatments, completely suppressing mitosis, the initial cells of the axes undergo differentiation taking an organization similar to that of the internodal cells. This differentiation is quite comparable to the evolution of the apical cell of the whorled branches which — after functioning for some time as an initial — stops dividing and changes into an internodal-looking cell. It appears, therefore, that experimental growth suppression in the apex of *Chara* has the same consequences as the normal arrest in the evolution of the whorled branches; these have, in fact, the value of axes with a limited growth (DELAY 1958).

Contrasted with the very common differentiation of apexes into parenchymatous structures, the case of vascular differentiation of lateral root primordia in the onion stands isolate. When lateral root primordia, induced by NAA treatment, are subjected to long exposure to colchicine solutions, growth by cell division is stopped, the cells of the primordium enlarging continuously by repeated chromosome doublings. Further on, lignification according to the typical scheme of vascular differentiation takes place (WITKUS and BERGER 1950). In quite a similar way differentiate the cells of lateral root primordia arrested by treatment with some concentrations of scopoletin. When growth suppression occurs in an initial stage of development, various cells may fuse into a syncyte, before vascular differentiation begins (D'AMATO 1954*b*). It seems probable that lignification of lateral root primordia arrested in their growth may be the result of an organizing influence exerted by the adjacent vascular strand of the main root. As to mitosis suppression in cambial zones, this can be induced by a variety of chemicals; *a.o.*, reference may be

made to maleic hydrazide (GREULACH and HAESLOP 1954) and 2,4-D a high doses (D'AMATO 1957). In both cases — the plants investigated were the tomato and *Lupinus albus* respectively — the histological picture i dominated by the scanty interfascicular tissue and the very small amoun of xylem, resulting from suppression of development of metaxylem an secondary xylem.

Mitosis inhibition by high doses of 2,4-D is one aspect of the two phase action of growth substances on cell division. This problem ha been carefully investigated in the onion test by D'AMATO and AVANZ (1948, 1949); their observations have been confirmed by other investiga tors (cf. GORI and MAUGINI 1955). It is now well established that mitosi poisoning by growth substances is of the preprophase type, with onl one or possibly two exceptions (incidentally, I must confess that it wa the study of phytohormones which gave us rather clear ideas on th cytological mode of action of preprophase inhibitors). The other aspec of the two-phase action of growth substances on cell division is mitosi stimulation, both in the various meristems and in differentiated or nor mally non-dividing tissues.

Leaving aside the familiar phenomena of activation of the cambium and other tissues in stems, I will concentrate on a few points of specia interest. In root tips, mitosis stimulation is generally accompanied b change in polarity of some cell divisions, leading to an obvious increas in the files of cells in both the periblem and — at a lesser extent — i the plerome (cf. LEVAN 1939; BURSTRÖM 1942; D'AMATO and AVANZI 1948). Moreover, a dissociation of the effect on mitosis from the effect on growt is commonly observed with some concentrations of growth substances In some typical experiments, we were able to maintain very active divi sions in the root meristems for as long as 5-6 days, without any apparen elongation of the roots. The histological picture was that of a meriste made up by files of very short cells, with an increased transverse dia meter (D'AMATO and AVANZI 1948). The tremendous activation of th root pericycle under the influence of growth substances is a well know phenomenon, which has also been studied histologically by various inve stigators (cf. CARLTON 1943; D'AMATO and AVANZI 1948; WILDE 1951 ALLEN, ALLEN and NEWMAN 1953). The actively proliferating mass o fused root primordia not unfrequently assumes a superficial resemblanc to some unlimited growths, such as crown gall; also the histologica pattern of parenchymatous masses interspersed with nodules of shor scalariform tracheids is reminiscent of that of crown gall (cf. NOËL 1946 KUPILA 1956). As to mitosis stimulation in shoot tips, no much histolo

gical work has been carried out. Recently, SACHS and LANG (1957) have shown that gibberellin induces a significant increase in the mitotic frequency in the subapical region of the shoot apex of *Hyosciamus niger*, while the apical region is not affected. Moreover, the increased mitotic frequency relates mainly to the longitudinal divisions, the difference in transverse divisions, between treated and control plants, being not significat at the 1-percent level. That mitosis stimulation induced by gibberellic acid has no influence on patterns of differentiation has been demonstrated by GREULACH and HAESLOP (1958). They have found that, in the third internode of treated *Phaseolus* plants, the number of cells per internode was 2.28 times greater than in control internodes; however, the mean longitudinal, tangential and radial diameters of the cells in both the cortex and central cylinder was not different from that in the controls.

Another interesting feature of growth substances is their ability to induce dedifferentiation of differentiated plant tissues. Experimental mitosis stimulation in differentiated tissues, by revealing their inherent cytological conditions, has led to the demonstration that *a*) chromosome structural changes are not rare in mature non-dividing cells and *b*) endopolyploidy is the most widespread cytological process associated with histological differentiation (cf. D'AMATO 1952; GEITLER 1953; TSCHERMACK-WOESS 1956). There is, however, also evidence that growth substances can induce endopolyploidy by supernumerary interphasic chromonemal reproductions. A similar effect has been clearly observed in tobacco pith tissue cultured in a medium supplemented with IAA as well as in young apricot fruits sprayed with 2,4,5-T (NAYLOR, SANDER and SKOOG 1954; BRADLEY and CRANE 1955). This fits admirably in SKOOG's idea (1950, 1954) that the action of auxins in growth is intimately concerned with nucleic acid metabolism. Whether the other phase of the mitosis influencing action of auxins, *i.e.* mitosis inhibition, also works on the nucleic acid systems of the cell is still an open question.

Before closing this part of my Report, I will briefly consider mitostasis by naturally occurring inhibitors, such as are found in leaves of plants in flower as well as in the mature tissues of potato tubers, onion bulbs and maple buds. It seems problable that these inhibitors may serve as an aid to any natural host defense mechanism against abnormal cell proliferation (ROBERTS, STRUCKMEYER and FOGELBERG 1957); their presence in mature tissues might also explain the unability of these tissues to proliferate under normal conditions (STEWARD and CAPLIN 1952).

II. Spindle inhibition

Spindle inhibition with metaphase arrest is the cytological effec typical of colchicine, the prototype of spindle inhibitors. In plant cells colchicine-influenced mitosis, or C-mitosis, is a reiterative process, many C-mitotic cycles occurring in one and the same cell by prolonged expo sure to the drug. If reiteration of the C-mitotic effect is taken as prerequisite for typical spindle inhibiting action, the number of sub stances possessing a similar cytological effect to colchicine is not very large (cf. D'Amato 1959). Since chromosome doubling results from every metaphase arrest in the case of full spindle inhibition (Ostergren's « full C-mitosis », 1944) very high polyploidy can be obtained. In the root pericycle of the onion, which is the most sensitive to colchicine action (Mangenot 1942), cells can stand as many as 7 C-mitotic cycles (nearly 2.000 chromosomes in the cell, starting from the initial 16) before dege neration sets in (D'Amato and Avanzi 1948). In the meristematic cells of both the root and the shoot tip, the degree of ploidy obtainable by prolonged exposure to C-mitotic agents is much lower; nevertheless, the cells soon stop dividing and the apex may either differentiate into a parenchymatous structure (cf. Mangenot 1942; Ennis 1948) or undergo necrotic changes. Necrosis also occurs in actively dividing crown gall cells after a prolonged action of colchicine (Dermen and Brown 1940). In the shoot tip of *Tradescantia,* when the induced polyploidy does not exceed 32*n,* the diploid and tetraploid cells soon overgrow the highly polyploid ones, which later on degenerate (Mc Gowan and Bishop 1953). This competition between diploid and variously polyploid cells seems to be a common feature of apical meristems recovering from a polyploidiz ing action.

Depending on the method of application of the polyploidizing agent the distribution of the cell divisions in the apex and other circumstances the cytochimeras obtained may be of different types such as : mosaic-like (the most common ones), sectorial and periclinal. In the case of peri clinal chimeras, with a polyploid condition localized in 1,2 or several tissue layers in the shoot apex, the « tagging » of different layers with different chromosome numbers has greatly helped in tracing the onto geny of fundamental tissues in various organs, such as stem, leaf, flower fruit, in plant species as different as *Datura,* cranberry, apple and peach. In this connection, mention must be made of the fundamental works of Satina and Blakeslee (cf. 1941, 1943), Dermen (1947, 1953

1955), DERMEN and BAIN (1944), BLASER and EINSET (1948, 1950). As to patterns of histological differentiation, it has been shown, in cranberry, that polyploidy in the internal tissues of the stem mainly brings about cell enlargement without increasing cell number. On the contrary, cell number and size in the epidermis is affected both by polyploidy and by the cytological conditions of the underlying tissue. Thus, in case of a polyploid epidermis covering diploid internal tissues, the epidermal cells become larger in size but fewer in number; when epidermis remains diploid and internal tissues are polyploidized, cell size in the epidermis remains normal, but cell number is increased (DERMEN and BAIN 1944). Changes in size and form of cells in dependence of polyploidy are also obvious in shoot tips. Thus, in colchicine-induced tetraploid *Vinca rosea*, the cells of the tunica and the first layer of the corpus show a marked increase in lateral dimensions, but no increase in vertical dimensions. However, the general organization of the shoot apex remains unchanged, a two-layered tunica and a central corpus being observed in both the tetraploid and the diploid (CROSS and JOHNSON 1941).

Considering now the disturbances of spindle activity, which may be induced by low doses of C-mitotic agents, these include: *a*) multipolar spindle formation; *b*) chromosome segregation followed by the organization of two separate spindles in one and the same cell; *c*) abnormal movement of one or a few chromosomes in a normal bipolar mitosis. The last two phenomena are especially important in connection with differentiation. It is the merit of HUSKINS and his Collaborators to have proved that, under the influence of some chemical or physical actions, the somatic chromosome complement may segregate into two groups, which are able to organize two separate spindles in the cell. The result will be reduction in chromosome number, which, in the case of «homologous segregation», will lead to the production of four haploid nuclei in a diploid cell; in practice, the result of a meiosis in a somatic cell (HUSKINS 1948; HUSKINS and CHENG 1950). That chromosome segregation may be a naturally occurring process of reduction in chromosome number has crearly been shown by VAARAMA (1949) in the root tips of a colchicine induced tetraploid *Ribes nigrum* ($4n = 32$). Also color mosaic formation in the petals and leaves of some polygenomic hybrids in *Gossypium* can easily be explained as being due to somatic reduction, cytological evidence of which has been found in some cases (MENZEL and BROWN 1952).

As to the aberrant movement of single chromosomes, it generally results from metaphase non-congression followed by non-disjunction (cf.

AVANZI 1956; D'AMATO 1959). This phenomenon is responsible for los or gain of whole chromosomes in a somatic complement, leading to mo saic patterns of chromosome numbers in meristems (cf. HEGWOOD an HOUGH 1958). The consequences of non-disjunction will be obvious i marker genes are present in the chromosome (s) affected. Thus, som color mosaics in the leaves of maize and in the petals of tobacco fin their explanation in the aberrant movement of a ring-shaped chromosom (Mc CLINTOCK 1932; STINO 1940).

III. CYTOKINESIS INHIBITION

The most known group of inhibitors in this category is that o purine derivatives, typically inhibiting membrane formation at telo phase, without interfering with the normal course of mitosis from pre prophase to anaphase. Only at high doses, these substances can induc a preprophase inhibition. Lack of cytokinesis may lead either to binucleate cell or to a multinucleate cell, in case the chemical action i prolonged for two or more mitotic cycles. Fusions of nuclei in bi- an multinucleate cells obtained by treatment with purine derivatives hav also been observed (cf. GOSSELIN 1940; KIHLMANN 1949; KIHLMANN an LEVAN 1949).

To my knowledge, no detailed study is available on the pattern of histological organization and differentiation following treatment wit inhibitors of cytokinesis. A similar study would be highly desirabl in an attempt to elucidate some structural aspects of such short-live tissues, as the endosperm and the anther tapetum, in which lack o membrane formation, polynucleation and nuclear fusions are of ver common occurrence (cf. D'AMATO 1952).

At the end of my Report, it appears that the experimental contro of mitosis by chemical agents can greatly advance our knowledge of th process of differentiation in two distinct ways:

1) by inducing the most various deviations from normal mitosis which is the prerequisite for normal differentiation;

2) by forcing differentiated cells to disclose, through dedifferentia tion, all or some of the characteristics inherent to the differentiate state.

In view of these advantages, it is astonishing how little effort ha so far been made to utilize mitotic poisons in studies on differentiatio in plants.

REFERENCES

ALLEN E. K., ALLEN O. N. and NEWMAN A. S., 1953. — *Pseudonodulation of leguminous plants induced by 2-bromo-3,5-dichlorobenzoic acid.* Amer. J. Bot., **40**: 429-435.

AVANZI S., 1956. — *« Non-congressione », « non-disgiunzione » ed altre aberrazioni mitotiche indotte dall'acetato di tallio in Allium cepa.* Caryologia, **9**: 131-148.

BIESELE J. J., 1958. — *Mitotic poisons and the cancer problem.* Elsevier Publ. Co., Amsterdam.

BLASER H. W. and EINSET J., 1948. — *Leaf development in six periclinal chromosomal chimeras of apple varieties.* Amer. J. Bot., **35**: 473-482.

—, 1950. — *Flower structure in periclinal chimeras of apple.* Amer. J. Bot., **37**: 297-304.

BRADLEY M. V. and CRANE J. C., 1955. — *The effect of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid on cell and nuclear size and endopolyploidy in parenchyma of apricot fruits.* Amer. J. Bot., **42**: 273-281.

BULLOUGH W. S., 1952. — *The energy relations of mitotic activity.* Biol. Rev., **27**: 133-168.

BURSTRÖM H., 1942. — *The influence of heteroauxin on cell growth and root development.* Ann. Agric. Coll. Sweden, **10**: 209-239.

CARLTON W. M., 1943. — *Histological and cytological responses of roots to growth-regulating substances.* Bot. Gaz., **105**: 268-281.

CROSS G. L. and JOHNSON T. J., 1941. — *Effects of colchicine upon the apical meristem of Vinca rosea.* Amer. J. Bot., **28** (Suppl. 10): 2s.

D'AMATO F., 1948. — *Prime osservazioni sulla inibizione pre-profasica della cariocinesi nei meristemi radicali.* Rend. Accad. Naz. Lincei, Cl. Sci. Fis., Ser. 8ª, **5**: 460-465.

—, 1950. — *The quantitative study of mitotic poisons by the Allium Cepa test: data and problems.* Protoplasma, **39**: 423-433.

—, 1952. — *Polyploidy in the differentiation and function of tissues and cells in plants. A critical examination of the literature.* Caryologia, **4**: 311-358.

—, 1954*a*. — *Action des facteurs physiques et chimiques sur la mitose.* VIII Congr. Internat. de Botanique, Rapports et Communications, Sect. **9**: 1-9.

—, 1954*b*. — *Osservazioni cito-istologiche sulla attività antimitotica e rizogena della cumarina e di cinque suoi derivati.* Caryologia, **6**: 160-179.

—, 1957. — *Effetti morfologici e istologici del 2,4-D nel Lupino.* Atti Soc. Tosc. Sci. Nat., B., **64**: 3-9.

—, 1959. — *C-mitosis and experimental polyploidy in plants.* Genetica Agraria, **11**: 1-13.

D'AMATO F. and AVANZI M. G., 1948. — *Reazioni di natura auxinica ed effetti rizogeni in Allium Cepa L. Studio cito-istologico sperimentale.* Nuovo Giorn. Bot. Ital., n. s., **55**: 161-213.

—, 1949. — *Primo contributo alla conoscenza dell'attività citologica e fisiologica delle sostanze di crescita sul testo Allium Cepa.* Caryologia, **2**: 31-54.

DELAY C., 1958. — *Action de la colchicine sur le Chara vulgaris. II. Action sur la croissance et sur la differenciation de l'appareil végétatif.* Rev. Cytol. et Biol. Vég., **19**: 1-62.

DERMEN H., 1947. — *Periclinal cytochimeras and histogenesis in cranberry.* Amer. J. Bot., **34**: 32-43.

—, 1953. — *Periclinal cytochimeras and origin of tissues in stem and leaf of peach.* Amer. J. Bot., **40**: 154-168.

—, 1955. — *Three additional endogenous tetraploids from giant apple sports.* Amer. J. Bot., **42**: 837-841.

DERMEN H. and BAIN H. N., 1944. — *A general cyto-histological study of colchicine polyploidy in cranberry.* Amer. J. Bot., **31**: 451-463.

DERMEN H. and BROWN N. A., 1940. — *A cytological study of the effect of colchicine on plant tumors.* Amer. J. Cancer, **38**: 169-190.

DEYSSON G., 1954. — *Sur les divers types d'action antimitotique.* VIII Congr. Internat. de Botanique, Rapports et Communications, Sect. **9**: 13-14.

ENNIS W. V., 1948. — *Some cytological effects of o-isopropyl-N-phenylcarbamate.* Amer. J. Bot., **35**: 15-21.

GEITLER L., 1953. — *Endomitose und endomitotische Polyploidisierung.* Springer Verlag, Vienna.

GIFFORD E. M., 1956. — *Some anatomical and cytological responses of barley to maleic hydrazide.* Amer. J. Bot., **43**: 72-80.

GORI C. and MAUGINI E., 1955. — *Effetti citologici e rizogeni di alcune sostanze di crescita.* Caryologia, **7**: 404-414.

GOSSELIN A., 1940. — *Action sur la mitose des végétaux de deux alcaloïdes puriques.* C. R. Acad. Sci., **210**: 544-546.

GREULACH V. A. and ATCHISON E., 1953. — *Inhibition of mitosis in bean buds by maleic hydrazide.* Bot. Gaz., **114**: 478-479.

GREULACH V. A. and HAESLOP J. G., 1954. — *Some effects of maleic hydrazide on internode elongation, cell enlargement and stem anatomy.* Amer. J. Bot., **41**: 44-50.

—, 1958. — *The influence of gibberellic acid on cell division and cell elongation in Phaseolus vulgaris.* Amer. J. Bot., **45**: 566-570.

HEGWOOD M. P. and HOUGH L. F., 1958. — *A mosaic pattern of chromosome numbers in the White Winter Permain apple and six of its seedlings.* Amer. J. Bot., **45**: 349-354.

HUSKINS C. L., 1948. — *Segregation and reduction in somatic tissues.* J. Heredity, **39**: 311-325.

HUSKINS C. L. and CHENG K. C., 1950. — *Segregation and reduction in somatic tissues. IV: Reductional grouping induced in Allium Cepa by low temperature.* J. Heredity, **41**: 13-18.

KIHLMAN B., 1949. — *The effect of purine derivatives on chromosomes.* Hereditas, **35**: 393-396.

KIHLMAN B. and LEVAN A., 1949. — *The cytological effect of caffeine.* Hereditas, **35**: 109-111.

KUPILA S., 1956. — *Anatomical and cytological development of crown gall.* Archiv. Soc. « Vanamo », **10**: 37-50.

LEVAN A., 1939. — *Cytological phenomena connected with the root swelling caused by growth substances.* Hereditas, **25**: 87-96.

MACKIE R. W., BLUME I. M. and HAGEN C. E., 1952. — *Histological changes induced in barley plants by radiation from P32.* Amer. J. Bot., **39**: 229-237.

MANGENOT G., 1942. — *Action de la colchicine sur les racines d'Allium Cepa.* Hermann et Cie., Paris.

MCCLINTOCK B., 1932. — *A correlation of ring-shaped chromosomes with variegation in Zea Mays.* Proc. Natl. Acad. Sci., **18**: 677-681.

MCGOWAN L. I. and BISHOP C. J., 1953. — *A cytological study of colchicine induced nodal « tumors » in Tradescantia.* Cancer Res., **13**: 646-650.

MENZEL M. I. and BROWN M. S., 1952. — *Polygenomic hybrids in Gossypium. II. Mosaic formation and somatic reduction.* Amer. J. Bot., **39**: 59-69.

NAYLOR J., SANDER G. and SKOOG F., 1954. — *Mitosis and cell enlargement without cell division in excised tobacco pith tissue.* Physiol. Plantarum, **7**: 25-29.

NOËL C., 1946. — *Recherches anatomiques sur le « crown-gall ».* Ann. Sci. Nat., Bot., **7**: 87-146.

ÖSTERGREN G., 1944. — *Colchicine mitosis, chromosome contraction, narcosis and protein chain folding.* Hereditas, **30**: 429-467.

POLLOCK B. M., GOODWIN R. H. and GREEN S., 1954. — *Studies on roots. II. Effects of coumarin, scopoletin and other substances on growth.* Amer. J. Bot., **41**: 521-529.

ROBERTS R. H., STRUCKMEYER B. E. and FOGELBERG S. O., 1957. — *Chemically induced cell proliferation and its inhibition by naturally occurring antiauxin.* Science, **126**: 206-207.

SACHS R. M. and LANG A., 1957. — *Effect of gibberellin on cell division in Hyoscyamus.* Science, **125**: 1144-1145.

SATINA S. and BLAKESLEE A. F., 1941. — *Periclinal chimeras in Datura Stramonium in relation to development of leaf and flower.* Amer. J. Bot., **28**: 862-871.

—, 1943. — *Periclinal chimeras in Datura in relation to the development of the carpel.* Amer. J. Bot., **30**: 453-462.

SKOOG F., 1950. — *Chemical control of growth and organ formation in plant tissues.* Ann. Biol., **26**: 545-562.

—, 1954. — *Substances involved in normal growth and differentiation of plants.* Brookhaven Symp. Biol., **6**: 1-21.

STEWARD F. C. and CAPLIN S. M., 1952. — *Investigations on growth and metabolism of plant cells. III. Evidence for growth inhibitors in certain mature tissues.* Ann. Bot., **16**: 477-489.

Stino R. P., 1940. — *Inheritance in Nicotiana tabacum. XV.* J. Heredity, **31**: 19-24.

Struckmeyer B. E. and Roberts R. H., 1955. — *The inhibition of abnormal cell proliferation with antiauxin.* Amer. J. Bot., **42**: 401-405.

Swann M. M., 1957. — *The control of cell division: a review. I.* Cancer Res. **17**: 727-757.

—, 1958. — *The control of cell division: a review. II.* Cancer Res., **18**: 1118-1160.

Tschermak-Woess E., 1956. — *Karyologische Pflanzenanatomie.* Protoplasma, **46**: 798-834.

Vaarama A., 1949. — *Spindle abnormalities and variations in chromosome number in Ribes nigrum.* Hereditas, **35**: 136-162.

Wardlaw C. W., 1955. — *Responses of a fern apex to direct chemical treatment.* Nature, **176**: 1098-1100.

Wilde M. H., 1951. — *Anatomical modifications of bean roots following treatment with 2,4-D.* Amer. J. Bot., **38**: 79-91.

Witkus E. R. and Berger C. A., 1950. — *Induced vascular differentiation.* Bull. Torrey Bot. Club, **77**: 301-305.

SUMMARY

An attempt has been made to analyze some sources of somatic cell variation, resulting from experimental and natural actions on mitosis, in relation to the ensuing patterns of differentiation. The following three essential antimitotic effects have been considered: 1) Preprophase inhibition (or mitostatic action). The cyto-histological consequences of mitosis suppression in both shoot and root tips and in cambial zones have been analyzed. Mitosis suppression by relatively high doses of growth substances has been regarded as one aspect of the two-phase action of these compounds on mitosis. Consequently, consideration has been given the histogenetic phenomena connected with mitosis stimulation in normally proliferating regions as well as in differentiated tissues (dedifferentiation). 2) Spindle inhibition (C-mitotic action). Polyploidy, aneuploidy, and reductions in chromosome number resulting from suppression and/or disturbances of spindle and centromere activity have been regarded as the most prominent sources of cell variation *per se* and in relation to chimeras and mosaicisms. 3) Cytokinesis inhibition. The need for a detailed study of cytokinesis inhibitors is emphasized for any understanding of the significance of polynucleation in short-lived tissues (anther tapetum, endosperm).

RIASSUNTO

L'A. ha tentato una analisi di alcune fonti di variabilità delle cellule somatiche risultanti da azioni sperimentali e naturali sulla mitosi, anche in relazione ai processi di differenziazione che ad esse conseguono. Sono stati presi in considerazione i seguenti

tre effetti antimitotici essenziali: 1) Inibizione preprofasica (o azione mitostatica). Sono state analizzate le conseguenze cito-istologiche della soppressione della mitosi negli apici del fusto e della radice e nelle zone cambiali. Siccome la soppressione della mitosi da parte di dosi relativamente alte di sostanze di crescita è stata considerata come uno dei due aspetti della azione difasica di queste sostanze sulla mitosi, si sono messi in risalto i fenomeni istogenetici connessi con la stimolazione della mitosi nelle regioni normalmente proliferanti e nei tessuti differenziati (sdifferenziamento). 2) Inibizione fusale (o azione C-mitotica). La poliploidia, l'aneuploidia e la riduzione del numero cromosomico, quali si realizzano in seguito alla soppressione o a disturbi della attività del fuso e dei centromeri, sono state considerate come le fonti più importanti della variabilità cellulare *per se* e in rapporto alle chimere e ai mosaici. 3) Inibizione della citocinesi. Si è posta in evidenza la necessità di uno studio dettagliato degli inibitori della citocinesi allo scopo di poter comprendere il significato della condizione plurinucleata in tessuti a vita breve (tappeto dell'antera, endosperma).

F. M. GEROLA, F. CRISTOFORI e G. DASSÙ

RICERCHE SULLE INFRASTRUTTURE DELLE CELLULE DEL MESOFILLO FOGLIARE DI PIANTE SANE E VIROSATE DI TABACCO *(NICOTIANA TABACUM)*

A: PIANTE SANE

(con Tavola XLIV e una figura nel testo) *

In redazione: il 28 Dicembre 1959

In questi ultimi anni sono state effettuate numerose ricerche al microscopio elettronico, per stabilire la forma e la grandezza di moltissimi virus, e in particolare del virus del mosaico del tabacco (TMV), estratti dalle piante mediante tecniche di vario tipo. Le osservazioni che hanno accompagnato le indagini su virus isolati (BLACK *et al.*; SKOTLAND *et al.*; MATSUI; LEYON) sono peraltro ancora scarse, talune non molto dimostrative, e per lo più rivolte a stabilire la localizzazione del virus del mosaico nelle cellule, e a riconoscere, nei cloroplasti, le eventuali modificazioni di struttura determinate dalla presenza del TMV.

Va anche aggiunto che i risultati delle ricerche citologiche eseguite a quest'ultimo riguardo sono piuttosto discordanti; e che quelle al ME, soprattutto per l'imperfezione delle tecniche usate, non hanno ancora dato esauriente risposta a problemi d'importante rilievo. Apertissima, fra l'altro, rimane la seguente fondamentale questione: se la presenza del TMV induca la demolizione e la scomparsa della clorofilla anche in cloroplasti già adulti, oppure se la sua azione si limiti ad ostacolare la normale differenziazione dei cloroplasti, fin dai primi stadi del loro sviluppo, senza interferire sulla struttura dei plastidi verdi, che sono già completamente sviluppati al momento dell'infezione.

Le indagini al MO e quelle compiute su estratti di foglie, con l'intento di determinare eventuali modificazioni nella composizione dei pigmenti clorofilliani nelle piante virosate (1), hanno indotto taluni studio-

* Lavoro eseguito presso l'Istituto Botanico dell'Università di Milano; fotografie eseguite presso il Centro di Microscopia Elettronica del Politecnico di Milano.

(1) La bibliografia a questo proposito è riferita nei più recenti testi sui virus vegetali.

si ad affermare che il virus del mosaico, non ha alcuna azione sui cloroplasti già differenziati; e che l'ingiallimento di parte del mesofillo è dovuto unicamente all'aberrante sviluppo dei plastidi verdi, come conseguenza della inibita sintesi di clorofilla. Tali affermazioni hanno trovato un certo appoggio anche nella osservazione che nel caso di infezioni sistemiche le foglie adulte delle piante di Tabacco, infettate con il TMV, non presentano sintomi di mosaico, verosimilmente per l'impossibilità da parte del virus di ledere cloroplasti già completamente differenziati.

Altri ricercatori, per contro, sostengono che il virus agisce principalmente, od esclusivamente, determinando una progressiva demolizione della clorofilla dei cloroplasti già formati, in conseguenza di una esaltata attività clorofillasica nelle foglie. A riprova di tale asserto si fa osservare, tra l'altro, che non è affatto vero che nelle foglie adulte non possano mai manifestarsi ingiallimenti del mesofillo, e che, anzi, sintomi evidenti di mosaico compaiono anche in foglie già completamente sviluppate, quando l'infezione venga fatta con dosi massicce di virus o su foglie distaccate dalla pianta. Sembrerebbe quindi di poterne concludere che la possibilità di modificare la struttura dei cloroplasti adulti, da parte del virus, sia più un fatto quantitativo che qualitativo, legato, in altre parole, alla «quantità» di infezione.

La questione si riconnette ad un altro punto oscuro — come uno di noi (Gerola) ha già prospettato in una Nota preliminare — il quale riguarda la localizzazione intracellulare del TMV. Vi ha chi ritiene che il TMV si insedi nei cloroplasti, e che qui trovi un ambiente particolarmente favorevole alla sua moltiplicazione: opinione che trova conferma anche in alcune ricerche effettuate al ME su cloroplasti estratti (Leyon) o su sezioni di foglie (Black *et al.*; Skotland *et al.*). Qualora i risultati di queste indagini (che a noi peraltro non sembrano affatto convincenti) venissero dimostrati in modo indubbio, si dovrebbe concludere che il TMV può moltiplicarsi a spese di organuli cellulari molto poveri di acido ribonucleico (RNA) impiegando in maniera preferenziale le sostanze costituenti i cloroplasti, o derivanti dall'attività di questi organiti, in confronto di quelle che costituiscono il citoplasma o gli altri organuli cellulari, o che derivano dalla loro attività.

Nettamente contrastante con questa è invece l'idea che il TMV abbia — seppure in maniera non esclusiva — localizzazione citoplasmatica; inclinano a tale opinione le conclusioni di alcuni degli stessi Autori ora ricordati (Black *et al.*), quelle di Brandes e quelle che Matsui trae in una sua Nota introduttiva di recente pubblicazione.

Allo scopo di contribuire al chiarimento di queste questioni abbiamo ritenuto indispensabile stabilire anzitutto, come punto di partenza, i caratteri delle infrastrutture dei cloroplasti di piante sane di Tabacco (finora descritte in modo piuttosto approssimativo da COHEN e BOWLES su cloroplasti estratti dalle foglie) onde potere poi estendere l'indagine alla localizzazione intracellulare del TMV e alle alterazioni strutturali dei cloroplasti, e di altri costituenti cellulari, nelle foglie giovani e in quelle via via più adulte, con evidenti sintomi di ingiallimento della lamina fogliare. In questa Nota riferiamo i risultati delle nostre osservazioni sulle infrastrutture «normali», ponendo così i preliminari per lo studio delle infrastrutture «alterate», di cui riferiremo in una Nota successiva.

MATERIALI E TECNICHE

Le ricerche sono state compiute su giovanissime foglioline della gemma e su foglie progressivamente più adulte, di piante di Tabacco (*Nicotiana tabacum*), coltivate in serra, di individui sani e di individui da noi infettati con il TMV, e presentanti molto evidenti i sintomi del mosaico. Dalle foglie mosaicate sono stati prelevati campioni dalle parti verde-intenso e da quelle via via più gialle.

Minuti pezzetti di lamina fogliare, di circa 1 mm di lato, sono stati rapidamente prelevati e immersi in soluzione di acido osmico all'1%, a circa 3° C, tamponato secondo Palade a pH 7,2, e lasciati in fissatore a 3° C per tempi variabili dalle 4 alle 18 ore. Dopo disidratazione in alcool, i pezzettini sono stati inclusi in miscela di metacrilati (8 parti di butilmetacrilato e 2 parti di metilmetacrilato), lasciandoli in presenza di benzoilperossido, come catalizzatore, per 48 ore a 60° C. Onde evitare la formazione di bolle d'aria nelle capsuline di gelatina attorno ai pezzetti inclusi, e per impedire eventuali alterazioni dei tessuti, dovute alla diminuzione di volume dei metacrilati durante la loro polimerizzazione, si è sempre determinata una polimerizzazione preliminare della miscela di metacrilati.

Le sezioni ultrasottili sono state effettuate con ultramicrotomo Philips. Le osservazioni e le fotografie sono state eseguite al ME Philips 100 MV.

Risultati

Cloroplasti di foglie di piante sane. A piccolo ingrandimento (circa 5000 ×) le cellule dei tessuti lacunoso e a palizzata delle foglie di Tabacco, mostrano numerosi cloroplasti affusolati e che, essendo la maggior parte della cavità cellulare occupata da un enorme vacuolo centrale, sono addossati alla membrana. Per lo più essi sono leggermente distanziati fra di loro e costantemente intercalati con uno o più mitocondri.

Ovviamente, e com'è la regola generale per i plastidi clorofilliani delle piante superiori, anche i cloroplasti di Tabacco sono provvisti di una doppia membrana (fig. 1) che delimita una sostanza granulare fondamentale (stroma o sostanza stromatica), nella quale possono trovarsi oltre ad uno o più globuli (2), di dimensioni variabili e di solito in piccolo numero, anche alcune granulazioni di amido e numerose formazioni scure (lamelle stromatiche) sempre appaiate, che collegano fra di loro i dischi dei grani.

Sulla struttura dei cloroplasti normali di Tabacco esistono — oltre ad una semplice fotografia di un cloroplasto sezionato trasversalmente (Palade) — alcune osservazioni effettuate al ME da Cohen e Bowler su plastidi isolati (mediante triturazione e successiva centrifugazione delle foglie), secondo le quali essi sarebbero attraversati da lamelle chiare alternate a lamelle scure, dello spessore rispettivamente di 210 A e di 140 A, colleganti i grani, dischiformi, del diametro di 0,32 μ, dello spessore di 0,075 μ - 0,18 μ, e formati da un regolare alternarsi di lamelle scure e chiare, ugualmente spesse (70 A).

Questi dati, a nostro avviso, sono scarsamente attendibili sia perchè in contrasto con quanto sembra ormai acquisito sulla struttura dei cloroplasti (mai, infatti, sono state osservate lamelle stromatiche di spessore superiore a quello delle lamelle dei grani), sia anche perchè notevolmente discordanti con quanto noi abbiamo potuto osservare e documentare. Innanzi tutto, infatti, risulta dalla nostra documentazione fotografica che la estensione dei grani non è rigidamente costante, ciò che concorda, del resto, con quanto è stato rilevato anche in altre piante (Abel); persino nel medesimo cloroplasto, anzi, (fig. 1) è possibile riscontrare grani di molto differente grandezza. I più grossi, in verità,

(2) Seguiamo in questo caso la terminologia adottata da Wettstein.

corrispondono per spessore (0,18 μ) e per diametro (0,3 - 0,4 μ) a quel misurati nei cloroplasti separati mediante centrifugazione da COHEN BOWLER; altri grani, peraltro, sono costituiti da un piccolo numero dischi, hanno diametri molto maggiori (0,55 μ) e uno spessore notevo mente ridotto (0,02 μ).

Le differenze più fondamentali, nei confronti dei rilievi di COHE e BOWLER, riguardano tuttavia, più che il volume dei grani, lo spesso delle lamelle stromatiche. Secondo gli Autori citati, infatti, le lamell stromatiche avrebbero uno spessore doppio e talora addirittura tripl di quello delle lamelle dei grani; dalle nostre fotografie risulta inve che le lamelle stromatiche sono spesse appena la metà (35 A) di quel interne dei grani (75 A). Questa così fondamentale discordanza di r perti può forse essere attribuita al perfezionamento delle tecniche allestimento delle sezioni ultrasottili che ha permesso un maggior riso vimento di strutture, che metodi meno perfezionati hanno, forse, fatt apparire omogenee.

Interesse del tutto particolare ci sembra meritino — nel cloropl sto delle foglie di Tabacco — i grani per così dire più semplici che, cio sono formati da due soli dischi. Tali grani risultano evidentemente c stituiti da due lamelle stromatiche strettamente ravvicinate per un cert tratto. L'origine del grano per semplice «somma» di due lamelle str matiche viene confermata innanzi tutto dal fatto che lo spessore deg straterelli chiari interposti tra le lamelle scure è uguale sia nel gra che nelle lamelle stromatiche appaiate (40 A); in secondo luogo, dal constatazione che mentre le due lamelle scure più esterne del gra (sopra e sotto) hanno lo stesso spessore degli strati scuri delle lamel stromatiche (35 A), la lamella scura centrale presenta uno spesso doppio (75 A), come se, appunto, fosse costituita dall'insieme di due l melle stromatiche che si sono accollate strettamente.

Se l'ulteriore aumento del numero dei dischi del grano è dovuto ripetersi del processo di riavvicinamento di lamelle stromatiche, dovre bero essere possibili alcune constatazioni quali: lo spessore costan di 40 A (come nelle lamelle stromatiche) di tutti gli straterelli chia interposti, nel grano, fra le lamelle scure; la presenza, agli opposti l del grano e in corrispondenza di ogni sua lamella interna, di due l melle stromatiche convergenti ad angolo; infine il mantenimento del differenza di spessore tra lamelle esterne e lamelle interne del gra Ciò è quanto effettivamente si osserva nei grani dei cloroplasti di T bacco, anche in quelli di maggiori dimensioni, nei quali: *a*) lo spesso degli straterelli chiari è sempre uguale a quello che si ha, fuori del gr

no, nelle lamelle stromatiche; *b*) è possibile riconoscere in più punti che le lamelle stromatiche, avvicinandosi ad un grano, convergono a due a due in modo da formare un angolo, il cui vertice è rivolto verso il grano. Nell'interno del grano, inoltre, le lamelle raddoppiano il loro spessore proprio come se risultassero dall'appaiamento di due lamelle stromatiche, e (per ripetere con parole diverse l'osservazione testè fatta) passando dal grano allo stroma le lamelle sembrano biforcarsi; *c*) le due lamelle esterne — che nella sezione delimitano il grano rispettivamente verso l'alto e verso il basso — sono spesse 35 A, cioè la metà dello spessore delle altre lamelle scure, interne, del grano (3).

I rapporti tra lamelle dello stroma e lamelle dei grani, quali noi li abbiamo delineati, non corrispondono a quanto HODGE *et al.* ritengono di aver osservato nei cloroplasti di *Mais*. Secondo questi studiosi, infatti, i rapporti tra lamelle dei grani e lamelle dello stroma sarebbero addirittura rovesciati, nel cloroplasto di *Mais*, rispetto a quanto noi riteniamo di poter concludere per i cloroplasti di Tabacco. L'interpretazione di HODGE è che nei cloroplasti, in prossimità dei grani, le lamelle stromatiche anzichè avvicinarsi fra di loro a due a due, si biforchino, in modo da dare origine alle due lamelle di un disco, con un processo analogo a quello che avrebbe rilevato WETTSTEIN per l'orzo (4). Ne deriva che le lamelle interne dei grani non subirebbero mai una apparente fusione con le due lamelle vicine, cosicchè il loro spessore dovrebbe essere sempre uguale a quello delle lamelle stromatiche. Nel Tabacco, in altre parole, le lamelle sembrerebbero biforcarsi passando dal grano allo stroma, ma tale biforcazione sarebbe soltanto apparente altro non essendo, in realtà, che la separazione di due lamelle che, nel grano, sono stretta-

---

(3) Nonostante la forma che per comodità abbiamo dato alla nostra descrizione, si deve riconoscere che le nostre osservazioni non consentono di trarre conclusioni definitive circa l'origine dei grani dalle lamelle o, inversamente, delle lamelle dai grani.

(4) Durante la stampa di questa Nota è comparso un lavoro di WETTSTEIN (*Developmental Changes in Chloroplasts and Their Genetic Control*, in « Developmental Cytology ») in cui vengono notevolmente modificati i valori in A delle lamelle stromatiche dei cloroplasti di Orzo, come pure viene parzialmente cambiata la concezione espressa in precedenza dal medesimo Autore sui rapporti esistenti tra lamelle stromatiche e lamelle dei grani. Mentre dissente dall'interpretazione di HODGE, con questo suo ultimo lavoro WETTSTEIN esprime delle idee alle quali quelle che noi qui illustriamo e che uno di noi (GEROLA) ha già espresso in una precedente Nota sono più prossime.

mente accoppiate; nel *Mais*, invece, e secondo l'interpretazione di Hodge, la biforcazione sarebbe effettiva e si realizzerebbe quando, passando dallo stroma al grano, ogni lamella si biforca. È evidente che entrambe le interpretazioni corrispondono a situazioni reali, ne dovrebbe derivare quest'altra differenza: che nei cloroplasti di Tabacco (e la cosa si ripete anche in quelli di Pisello, che noi stessi abbiamo in precedenza studiato; inoltre in quelli di Pomodoro studiati da Lefort) le lamelle più esterne di ogni grano hanno uno spessore pari alla metà di quelle interne, mentre nei cloroplasti di *Mais* studiati da Hodge lo spessore delle lamelle esterne di ogni grano dovrebbe essere uguale a quello delle lamelle interne; disgraziatamente Hodge non è esplicito su questo fondamentale particolare.

Nel Tabacco, l'origine delle lamelle interne dei grani per apparente fusione di lamelle stromatiche non può essere direttamente osservato in tutti i dischi dei grani, nella maggior parte dei quali anzi non appare possibile riconoscere questa stretta correlazione tra lamelle del grano e lamelle stromatiche. Questo fatto, che se fosse di origine primaria sarebbe in contrasto con quanto da noi sopra affermato, risulta come secondario e dipendente dalla tendenza che vi è nel cloroplasto di ridurre il numero delle lamelle stromatiche, a vantaggio di un aumento numerico e volumetrico dei grani. Si viene così a creare nei cloroplasti una sproporzione sempre maggiore tra il numero delle lamelle stromatiche e quello dei dischi dei grani, con la conseguenza che divengono via via più frequenti i dischi che non si continuano verso lo stroma con lamelle o che sono uniti a lamelle stromatiche solo da un lato, in modo analogo a quanto osservato nel Pomodoro da Lefort (5). L'esistenza nei cloroplasti maturi di una tendenza alla riduzione progressiva delle lamelle stromatiche viene confermata d'altro lato dalla constatazione che, in molte zone del cloroplasto, le lamelle stromatiche non appaiono più continue, ma sono invece spezzettate in tanti frammenti e quindi in apparente via di riduzione.

Tale processo di riassorbimento delle lamelle stromatiche sembra collegarsi, almeno in parte, al completamento della differenziazione dei dischi dei grani. Molto di frequente, infatti, si osserva come, ad una certa distanza dal grano, le due lamelle stromatiche appaiate si fondano;

(5) A questo proposito è da rilevare che Wettstein, nel lavoro di recentissima pubblicazione già menzionato, asserisce che Lefort avrebbe ultimamente accertato che nei cloroplasti adulti di Pomodoro si ristabilirebbe il rapporto di 1:1 tra il numero delle lamelle stromatiche e delle lamelle dei grani.

nentre le parti distali, rispetto al grano, tendono a scomparire, quelle prossimali si conservano e formano come dei monconi appuntiti che sporgono lateralmente al grano (fig. 1). Siffatto processo di fusione, recentemente osservato anche da LANCE nei cloroplasti di *Chrysanthemum,* è sovente accompagnato dal depositarsi, ai margini del grano, di una sostanza opaca al ME, la quale dà origine a granulazioni di forma e dimensioni variabili. Il processo di fusione, peraltro, non interessa tutte le lamelle originariamente collegate ai singoli dischi dei grani; e ne deriva che, in ogni grano, si possono avere successioni molto variabili di lamelle a due a due connesse, oppure non connesse ai margini fra di loro oppure con le lamelle stromatiche, di cui, in ogni modo, sono la continuazione. Ciò appare chiaro nel disegno (fig. 1 del testo)

Fig. 1 — Riproduzione schematica della struttura di un grano.

che riproduce fedelmente la struttura di un grano : alcune lamelle, vi appaiono saldate con la lamella stromatica solo ad un lato, cosicchè lo straterello chiaro fra loro interposto appare isolato dalla sostanza stromatica solo sul lato opposto, dove, per saldatura fra due lamelle vicine, il disco si è chiuso. Altre lamelle invece sono saldate fra loro all'estremità opposta rispetto al disco adiacente, oppure ad ambedue le estremità, così da formare dei dischi completamente chiusi. Altre lamelle non appaiono saldate in alcun modo a lamelle adiacenti. Il grano, di conseguenza, non presenta affatto la regolare struttura a dischi alternati a zone chiare non delimitate da depositi oscuri al ME — come descritto per i cloroplasti di *Aspidistria* e di altre piante — sebbene in molti grani si noti la prevalente tendenza ad un alternarsi di dischi che si prolungano lateralmente con sporgenze appuntite (e che spesso sono anche connessi con lamelle stromatiche) e di altri dischi (in numero di uno o due) che sono privi di tali prolungamenti, ma i cui straterelli chiari sono separati dalla sostanza stromatica mediante piccoli depositi

di sostanza opaca al ME. In definitiva, quindi, il grano è composto d un alternarsi di lamelle scure che talora si prolungano alquanto lat ralmente al grano, e di straterelli chiari che sono completamente isola dallo stroma o con esso in « continuità apparente » su un solo o su e trambi i lati. Anche per questi particolari i cloroplasti di Tabacco avvicinano notevolmente a quelli descritti per il Pomodoro.

Un altro punto molto importante, nei riguardi della struttura d cloroplasti di Tabacco, ci sembra essere quello che riguarda le lamel stromatiche. Qualunque sia il loro percorso, esse non sono mai cos tuite da una sola lamella scura, che potremmo definire « elementare bensì da due lamelle appaiate, delimitanti uno straterello chiaro 40 A. Se ne potrebbe dedurre che l'unità fondamentale del sistema l mellare dei cloroplasti di Tabacco, e probabilmente anche di altre D cotiledoni — almeno da quanto può dedursi dalle descrizioni e dal documentazioni fornite dai vari Autori — non sia la lamella singol bensì il complesso di due lamelle appaiate con la sostanza chiara inte posta. Queste, che potremmo definire « lamelle complesse » o « unità l mellari », sembrano invece mancare — in base a quanto affermano Autori che ne hanno effettuato le osservazioni al ME — nel *Mais* e nel Monocotiledoni finora esaminate. In queste piante infatti le lamelle co plesse sarebbero sostituite da lamelle semplici, non appaiate e che pera tro avrebbero una composizione non omogenea, apparendo costituite straterelli alternativamente chiari e scuri. Nell'Orzo, secondo WET STEIN, ogni lamella sarebbe costituita da due straterelli esterni, ognu di 20 A, tra i quali sarebbe interposta una zona più chiara di 10 A si tratta di una struttura che a nostro avviso è piuttosto ipotetica, m che in qualche modo ricorda — benchè sia di dimensioni minori — quel della « lamella composta » da noi osservata nel Tabacco. Nel *Mais* i vece, secondo HODGE *et al.*, ogni lamella sarebbe formata da una par centrale scura al ME — parte che dovrebbe essere di natura prevalent mente proteica — e da due straterelli più chiari ad essa addossati su opposti lati, che dovrebbero essere costituiti da lipidi. Le lamelle co

---

(6) Anche su questi punti WETTSTEIN ha recentemente modificato le sue precede affermazioni, nel senso che il cloroplasto di Orzo avrebbe lamelle scure appaiate con terposto uno strato chiaro. WETTSTEIN, di conseguenza, sembra inclinarsi a consider come « lamella stromatica » ciò che, in precedenza, egli interpretava come « straterell di una lamella.

poste del Tabacco, pur essendo analoghe a queste di *Mais* per lo spessore degli strati scuri e di quelli chiari, avrebbero quindi completamente invertiti i rapporti quantitativi e di posizione tra parti chiare e scure al ME, comprendendo un'unica zona chiara fiancheggiata da due lamelle scure.

Una tale inversione di rapporti tra parti chiare e scure delle lamelle nel cloroplasto di Tabacco e in quello di *Mais*, se effettiva, dovrebbe comportare una inversione anche dei rapporti quantitativi tra la parte clorofilproteica e quella lipoidica delle lamelle: conclusione che appare legittima se si ammette — sia pure come un'ipotesi non ancora sufficientemente dimostrata — che le lamelle scure al ME corrispondono ai luoghi di addensamento delle molecole clorofilproteiche, e che le lamelle chiare siano di natura lipoidica. Secondo i dati di HODGE, infatti, i cloroplasti di *Mais* avrebbero grani costituiti di strati proteici di 35 A alternantisi con strati lipoidici di 70 A (precisamente due strati proteici di 35 A appartenenti a due diverse lamelle adiacenti); mentre nelle lamelle dello stroma e dei grani dei cloroplasti di Tabacco, ogni strato lipoidico di 40 A sarebbe accompagnato da uno strato proteico di 70 A (precisamente da due strati di 35 A, separati nello stroma e ravvicinati — peraltro derivati da due lamelle diverse — nei grani).

Osserveremo, da ultimo, come non sembri sussistano differenze notevoli tra Monocotiledoni e Dicotiledoni, per quanto riguarda i rapporti di posizione nel cloroplasto, degli strati, delle lamelle e dei grani. Nei cloroplasti di Tabacco infatti (analogamente a quanto WETTSTEIN ha osservato nei cloroplasti di Orzo e contrariamente a quello che STEINMANN e SJÖSTRAND avrebbero rilevato in altre Dicotiledoni) non tutte le lamelle di uno strato decorrono sempre parallelamente fra di loro, così da collegare con buona regolarità tutti i grani situati presso a poco nello stesso piano longitudinale. Sono invece numerose le lamelle che ad un certo punto divergono dallo strato cui appartengono (e nel quale per un certo tratto avevano avuto decorso parallelo) e che vanno a collegare dischi di grani di strati differenti.

Strutture così differenziate come quelle da noi descritte e di cui pubblichiamo l'immagine, non si trovano peraltro nei cloroplasti di qualsiasi cellula delle foglie di Tabacco. Così, soprattutto in vicinanza delle nervature i cloroplasti presentano, anche nelle foglie adulte, strutture in certo modo primitive o poco differenziate. Essi sono più piccoli dei cloroplasti appartenenti alle cellule del palizzata e del lacunoso, sono molto ricchi di sostanza stromatica scarsamente opaca al ME, e hanno inoltre un numero molto ridotto tanto di grani che di lamelle

stromatiche. L'esistenza di siffatte differenze strutturali tra i cloropla sti di cellule parenchimatiche diverse e situate a diversa profondità ne lo spessore del mesofillo era già stata rilevata da noi (GEROLA *et al.*) ne Pisello e da HODGE nel *Mais*, sebbene, in quest'ultima pianta, le diffe renze non siano così pronunciate come quelle da noi poste in rilievo

Mitocondri. In prossimità dei cloroplasti, di solito verso la lor estremità affusolata, si trovano sempre alcuni mitocondri. La strut tura di questi organiti ripete quella ormai più volte descritta in altr piante. Essi appaiono, in sezione, di forma variabile, dalla tondeg giante (figg. 2 e 3), a quella leggermente elittica (fig. 4), a quella allun gata (fig. 5). Sono delimitati da una evidente doppia membrana, e pos seggono nel loro interno una modesta quantità di sostanza opaca al ME tanto da apparire, nel loro complesso, come formazioni piuttosto chiare Nei mitocondri di foglie di piante di Tabacco, le creste non sono ma lunghe come quelle osservate nei mitocondri di Pisello (GEROLA *et al.*) di *Elodea* (BUVAT) o di altre piante; al contrario, le loro creste son sempre piuttosto corte, tozze e rigonfie. In accordo con i rilievi orma generali, anche nei mitocondri di Tabacco l'origine delle creste appar legata al formarsi di introflessioni della membrana mitocondriale pi interna, con la quale mantengono evidenti collegamenti.

In vicinanza dei plastidi e dei mitocondri (figg. 6 e 7) si possono os servare con una certa frequenza, anche nel nostro materiale, alcune for mazioni delimitate da una membrana e caratteristiche per il loro conte nuto omogeneo e molto scuro al ME. Si tratta probabilmente di forma zioni analoghe a quelle recentemente descritte da GNÈVÈS *et al.* per l cellule vegetali e da LEYON e WETTSTEIN in *Fucus*.

BIBLIOGRAFIA

ABEL B., 1956. — *Ueber die Beeinflussung der Chloroplastenstruktur durch Licht be Anthirrhinum majus (haploid)*. Naturwissensch., **43**: 136-137.

BLACK L. M., MORGAN C. and WYKOFF R. W. G., 1950. — *Visualisation of Tobacco Mosai Virus within infected cells*. Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med., **73**: 119-122.

BRANDES J., 1955. — *Elektronenmikroskopischer Nachweis von Pflanzenviren in ihre Wirtszellen*. Naturwissensch., **42**: 102.

—, 1956. — *Ueber das Aussehen und die Verteilung des Tabakmosaikvirus im Blattge webe*. Phytopath. Zeitschr., **26**: 93-106.

BUVAT R., 1958. — *Recherches sur les infrastructures du cytoplasme, dans les cellules d*

méristème apical, des ébauches foliaires et des feuilles développées d'Elodea canadensis. Ann. Sc. Nat. Bot., **19**: 121-161.

COHEN M. and BOWLER E., 1953. — *Lamellar structure of the tobacco chloroplasts.* Protoplasma, **42**: 414-416.

GEROLA F. M., 1959. — *Azione della luce sullo sviluppo e la differenziazione dei plastidi di Pisello.* Nuovo Giorn. Bot. It., n. s., **66**: 506-508.

—, 1959. — *Rapporti tra virus e cellule nelle piante erbacee.* Ann. Microbiol., **9**: 315-327.

GEROLA F. M., CRISTOFORI F. e DASSÙ G., 1959. — *Sulla differenziazione e sull'infrastruttura dei cloroplasti di Pisello (Pisum sativum).* In corso di stampa.

—, 1959. — *Ricerche sullo sviluppo dei cloroplasti di Pisello (Pisum sativum). I. Sviluppo dei cloroplasti in piantine cresciute in condizioni di normale alternarsi di luce e di buio.* Caryologia, **13**: 164-178.

—, 1959. — *Ricerche sullo sviluppo dei cloroplasti di Pisello (Pisum sativum). II. Sviluppo dei cloroplasti in piantine eziolate e loro modificazioni durante il successivo inverdimento.* Caryologia, **13**: 179-197.

GNEVÈS L., LANCE A. et BUVAT R., 1958. — *Sur la présence, dans le cytoplasme végétale et sur la nature ergastoplasmique de costituants figurés analogues aux « lysosomes » ou aux « dense bodies » des cellules animales.* C. R. Ac. Sc., Paris, **247**: 2028-2030.

HODGE A. J., MC LEAN J. D. and MERCER F. V., 1955. — *Ultrastructure of the lamellae and grana in the chloroplasts of Zea Mays L.* J. Bioch. Biophys. Cytol., **1**: 605-614.

LEYON H., 1953. — *Virus formation in chloroplasts.* Exper. Cell Research, **4**: 362-370.

MATSUI C., 1958. — *Pathological Cytology of Tobacco Leaf Infected with Tobacco Mosaic Virus. III.* J. Biochem. a. Biophys. Cytol., **4**: 831.

PALADE G. E., 1952. — *A study of fixation for electron microscopy.* J. Exper. Med., **95**: 285-298.

STEINMANN E. and SJÖSTRAND F. S., 1955. — *The ultrastructure of chloroplasts.* Exper. Cell Research, **8**: 15-23.

SKOTLAND C. B., HAGEDON D. J. and STAHMANN M. A., 1955. — *Electron microscopy of tobacco mosaic virus in situ.* Phytopath., **45**: 603-607.

WETTSTEIN V. D., 1957. — *Genetics and the submicroscopic cytology of plastids.* Hereditas, **43**: 303-317.

—, 1957. — *Chlorophyll-letale und der submikroskopische Formwechsel der Plastiden.* Exper. Cell Research, **12**: 427-506.

SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA XLIV

Foglia adulta di Tabacco, porzioni di cellule mesofillari.

In tutte le figure il significato delle lettere è il seguente: *er* = ergastoplasma; g = grani dei cloroplasti; gl = globuli; l = formazioni analoghe a quelle viste in altre piante

e di funzione ancora sconosciuta; m = mitocondri; mc = membrana cellulare cellulosopectica; p = plastidi.

Fig. 1 — Cloroplasto con sistema lamellare molto evidente (150.000 ×).

Fig. 2 — Porzioni di cellule mesofillari nelle quali vi sono ampi vacuoli, cosicché il citoplasma con i mitocondri (m) e i plastidi é spostato a ridosso della membrana cellulosopectica (mc) (22.500 ×).

Fig. 3 — Porzione di cloroplasto con molto evidenti i grani da cui si dipartono le lamelle stromatiche (94.000 ×).

Fig. 4 — Mitocondri con evidenti creste corte e tozze (58.000 ×).

Fig. 5 — Porzione di cellula in cui vi è un plastidio (p) ricco di sostanza stromatica e provvisto di un evidente sistema lamellare e alcune differenziazioni di ergastoplasma (50.000 ×).

Fig. 6 — Tipico aspetto dei mitocondri del mesofillo di foglie adulte (63.000 ×).

Fig. 7 — Mitocondrio con corte creste (75.000 ×).

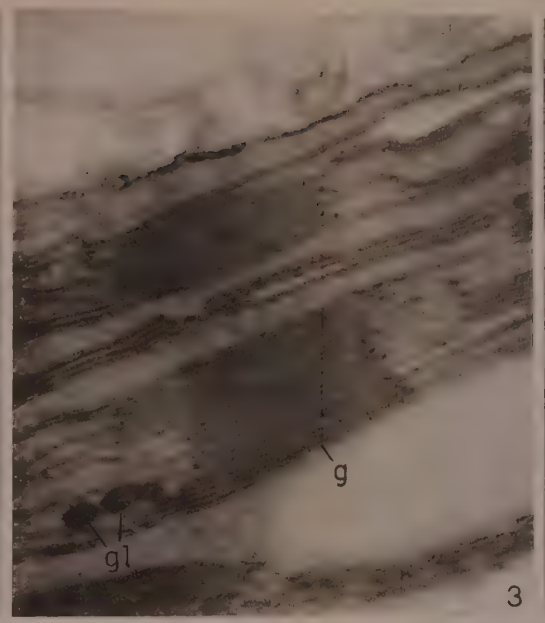
Fig. 8 — Porzione di cellula mesofillare, con un mitocondrio (m) a creste poco sviluppate e un plastidio (p) provvisto di un evidente sistema lamellare (63.000 ×).

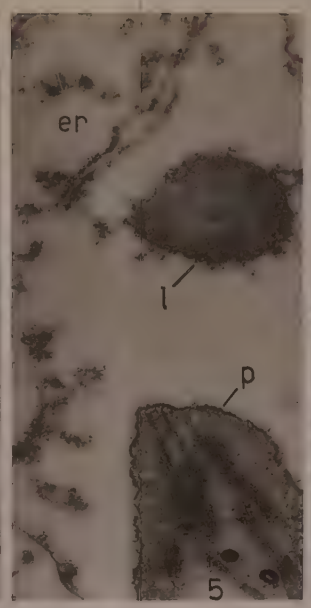
SUMMARY

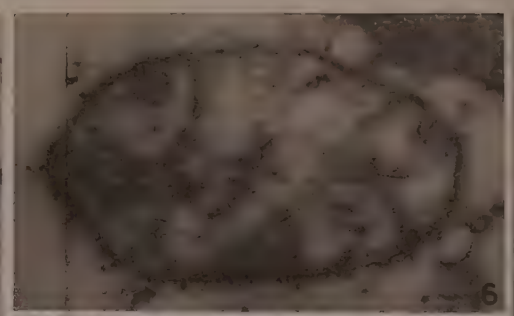
Studies on the infrastructure of mesophyll cells of the leaves of healthy and TMV-diseased Tobacco plants (Nicotiana tabacum). A. Healthy plants.

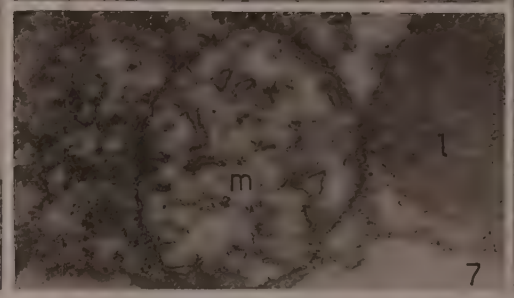
Observations at the electron microscope of ultrathin sections of Tobacco leaves, allow to remark some peculiarities in the infrastructures of some cell costituents.

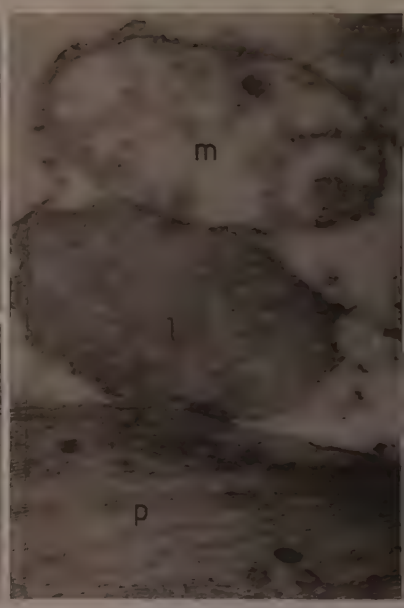
In the Tobacco chloroplasts, the stromatic lamellae are always paired, forming a « lamellar unity » or « complex lamella ». This is formed by two dark layers (each 35 A thick), between which there is a lighter one 40 A thick. The grana are very variable in size, and inside them there are light layers (40 A thick) regulary alternated by darker lamellae. The inner one are 70 A thick, while the two outer ones, on the upper and lower surfaces of the grana, are 35 A thick. In the adult leaves the grana appear to originate from the converging and pairing of stromatic « lamellar unities ». The number of stromatic lamellae does not correspond to the number of the grana discs, but is often lower; indeed the stromatic lamellae show a tendency to be reabsorbed. This phenomenon appears to be related to the complete differentiation of the grana discs, and to the fusion of stromatic lamellae, a little outside each grana. In the meantime, electronically dark granules, variable in shape and size, are laid down on both sides of the grana, where their discs are closing. As shown schematically in fig. 1, in the grana of Tobacco chloroplasts closed discs are never regulary alternated with lighter layers in apparent side-connection with stromatic substances. Tobacco chloroplasts, as those of other Dicotyledonous plants, appear therefore considerably different

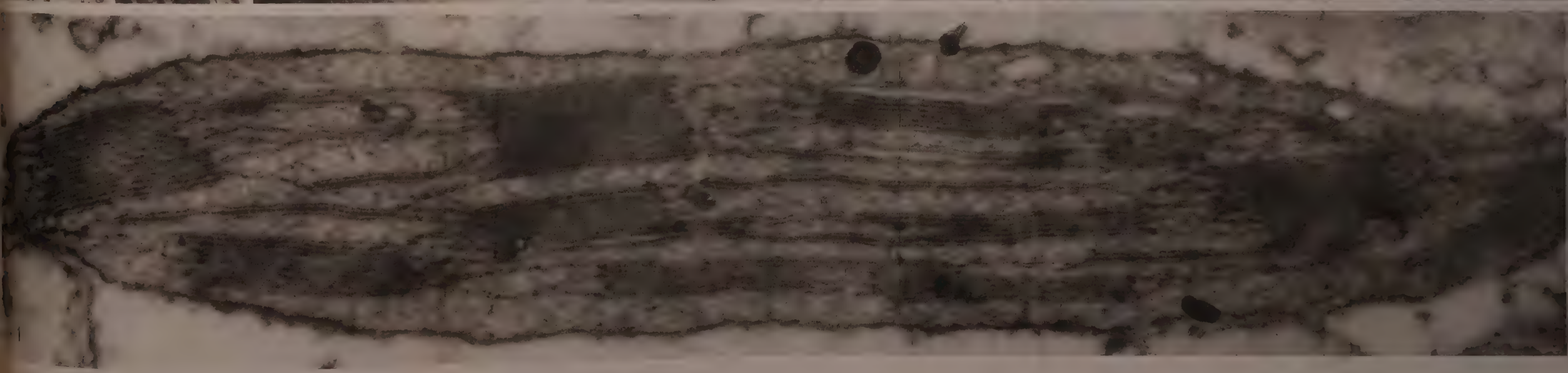












F. M. Gerola, F. Cristofori e G. Dassù - Infrastrutture del mesofillo di Tabacco. A. Piante sane.

in the structure of their « lamellar unity » from the schema reported by some Authors for the chloroplasts of some Monocotyledoneous plants. No difference could be detected in the progression of the stromatic lamellae which, as shown in barley plants, do not run always regulary in parallel lines, interesting only the grana of just one plane. On the contrary they are often irregulary divergent and some of the paired lamellae, usually running parallelely, connect sometimes grana laying on quite different planes of the plastid.

Less differentiated chloroplasts can be found in the cells of the mesophyll surronding the ribs. These are particulary rich of stromatic substances, not-dark at the electron microscope, and show a reduced infrastructural development of the grana and of the stromatic lamellae, which are sometimes lacking.

Mitochondria are similar to those of other plants. Their cristae are not long as those observed in pea (Gerola et al.) or *Elodea* (Buvat), and are somewhat swollen and thick-set.

In the neighbourhood of the mitochondria we have been able to observe the presence of some constituent, formed by a more or less homogeneous dark substances, very alike the one reported in some other plant.

RIASSUNTO

L'osservazione al ME di sezioni ultrasottili di foglie di piante di Tabacco (*Nicotiana tabacum*) ha permesso di riconoscere alcune particolarità sulle infrastrutture di alcuni componenti cellulari.

Nei cloroplasti maturi di Tabacco le lamelle stromatiche sono sempre ravvicinate a due a due costituendo in tal modo una « unità lamellare » o « lamella complessa » di ordine superiore, composta da due straterelli opachi (ognuno di 35 A) fra i quali è interposto uno straterello chiaro (di 40 A). I grani hanno dimensioni molto variabili ed in essi si alternano regolarmente straterelli chiari (di 40 A) e lamelle scure. Di queste, quelle interne hanno uno spessore di 70 A, mentre le due lamelle più esterne, sulla superficie inferiore e superiore del grano, hanno spessori di 35 A. Nelle foglie adulte è possibile osservare come l'origine dei grani appare legata al convergere ed allo stretto appaiarsi di « unità lamellari » stromatiche. Il numero delle lamelle stromatiche non corrisponde al numero dei dischi dei grani, ch'esse concorrono a formare, ma è quasi sempre inferiore, come conseguenza della tendenza al riassorbimento delle lamelle stromatiche. Tale fenomeno sembra essere correlato con il completamento della differenziazione dei dischi dei grani, ciò che porta alla fusione di lamelle stromatiche, poco fuori di ogni grano, ed è accompagnata dal depositarsi ai due lati del grano, dove i suoi dischi si chiudono, di granulazioni opache al ME, di grandezza e forma variabili. Come è stato indicato in modo schematico nella figura 1, nei grani dei cloroplasti di Tabacco non esiste mai

una regolare successione di dischi chiusi e di straterelli chiari, in apparente connessione laterale con la sostanza stromatica. I cloroplasti di Tabacco, come del resto quelli di altre Dicotiledoni, sembrano differire notevolmente, per quel che riguarda la struttura delle loro « unità lamellari », dagli schemi da altri proposti per i cloroplasti di alcune Monocotiledoni. Nessuna differenza è stata rilevata invece nei riguardi del decorso delle lamelle stromatiche, le quali, come già è stato descritto nell'Orzo, non decorrono mantenendosi regolarmente parallele fra di loro, così da interessare solo i grani che si trovano su un medesimo piano, ma assai spesso divergono in maniera irregolare, per modo tale che lamelle affiancate, in certi tratti, in un sol fascio, passano, in altri punti, a grani situati su piani molto diversi del plastidio.

Cloroplasti molto meno differenziati di quelli ora descritti si trovano nelle cellule del mesofillo attornianti le nervature; questi cloroplasti sono caratterizzati da una particolare abbondanza di sostanza stromatica non opaca al ME e dallo sviluppo molto ridotto dei grani e delle lamelle stromatiche (talora persino assenti).

Fondamentalmente simili a quelli di altre piante sono i mitocondri. Le loro creste, tuttavia, non sono così lunghe come quelle osservate nei mitocondri di Pisello (GEROLA *et al.* o di *Elodea* (BUVAT), e sono inoltre alquanto rigonfie e tozze.

In vicinanza dei mitocondri abbiamo rilevato la presenza di alcune formazioni a contenuto scuro e più o meno omogeneo, che hanno notevole somiglianza con quelle recentemente descritte in altre piante.

F. M. GEROLA, F. CRISTOFORI e G. DASSÙ

RICERCHE SULLE INFRASTRUTTURE DELLE CELLULE DEL MESOFILLO FOGLIARE DI PIANTE SANE E VIROSATE DI TABACCO *(NICOTIANA TABACUM)* B: PIANTE VIROSATE

(con Tavole XLV-XLIX) *

In redazione: il 28 Dicembre 1959.

Seguendo i criteri, gli scopi e le tecniche già illustrate in una Nota precedente (GEROLA *et al.*), abbiamo indagato al microscopio elettronico (ME) sullo sviluppo e la struttura dei cloroplasti di foglie di Tabacco infettate con il virus del mosaico del Tabacco (TMV), e sulla localizzazione intracellulare del virus stesso.

Cloroplasti. Nella maggior parte delle cellule delle foglie virosate i cloroplasti hanno forma diversa da quella affusolata dei plastidi verdi delle foglie sane. Loro caratteristica è d'essere per lo più rigonfi e così addossati l'uno all'altro (fig. 3) da giustificare l'impressione, che si ha al microscopio ottico (MO), di un loro concrescimento per tratti più o meno ampi. Queste forme aberranti, maggiormente frequenti nelle foglie più giovani, peraltro non rare anche in quelle ormai adulte, si possono considerare come indice d'un ritardo nella differenziazione dei cloroplasti; anche in altre piante, infatti, noi abbiamo potuto constatare come durante lo sviluppo dei plastidi clorofilliani si passi, nelle foglie più giovani, attraverso ad uno stadio a cloroplasti più rigonfiati di quelli delle foglie che hanno completato il loro sviluppo (GEROLA; GEROLA *et al.*).

Questa ipertrofia complessiva di tutto il plastidio, che di solito viene attribuita ad una maggiore idratazione dei colloidi plastidiali, è accompagnata da un notevole rigonfiamento dei dischi dei grani (figg. 2, 4 e 5). Tale rigonfiamento, che se fosse limitato alle cellule delle bozze fogliari potrebbe anche considerarsi normale, si mantiene a lungo e può sussiste-

* Lavoro eseguito presso l'Istituto Botanico dell'Università di Milano; fotografie eseguite presso il Centro di Microscopia Elettronica del Politecnico di Milano.

re persino in cloroplasti che hanno completato, o condotto molto avanti, il loro processo di differenziazione. In qualche cloroplasto (fig. 1) il rigonfiamento dei dischi dei grani può non essere uniforme dappertutto, cosicchè mentre ad un'estremità del plastidio lo stroma appare ipertrofico e i dischi presentano un evidente rigonfiamento, all'estremità opposta i grani presentano aspetto normale, e nelle zone intermedie si hanno strutture di transizione.

Se il rigonfiamento dei grani è molto precoce, si direbbe che esso sia sintomo visibile di un estremo rallentamento o addirittura dell'arresto dello sviluppo del cloroplasto; ne deriva che plastidi a struttura molto giovanile si possono trovare tanto in foglie giovanissime, quanto in foglie già adulte. Questi cloroplasti si riconoscono facilmente per il distanziamento del sistema di lamelle e di grani dalla duplice membrana plastidiale, ciò che è conseguenza del notevole spessore della sostanza stromatica periferica, e per i dischi dei grani notevolmente rigonfi e accompagnati, alle opposte estremità, da minute granulazioni scure (figg. 6, 10 e 15).

Se invece il rigonfiamento dei dischi dei grani è più tardivo, ed avviene in cloroplasti con grani già evoluti, sembra che le lamelle scure dei dischi subiscano una specie di riassorbimento. I grani diventano allora progressivamente più irriconoscibili fino quasi a scomparire, e la loro precedente esistenza viene documentata solo dalla più lunga persistenza delle granulazioni oscure sui loro margini (fig. 6). Questo processo di dissoluzione dei dischi dei grani è particolarmente frequente nelle zone depigmentate e gialle delle foglie adulte, ed appare molto simile a quello descritto da altri Autori (Frey-Wyssling e Kreutzer; Steffen e Walter) e che accompagna l'ingiallimento dei plastidi che, da cloroplasti, si trasformano in cromoplasti.

Le alterazioni che abbiamo ora descritte, se sono le più frequenti e le più generalizzabili tra quelle che noi abbiamo rilevato, non sono tuttavia le sole. Abbastanza frequenti, per esempio, sono i cloroplasti caratterizzati da un eccezionale accumulo di granuli di amido (fig. 8), spesso così voluminosi da occupare quasi tutto il plastidio. Non rari sono pure i cloroplasti con evidenti e numerose lacune (figg. 4 e 7), simili a quelli osservati da altri Autori (Stubbe e Wettstein) in cloroplasti nei quali grossi granuli di amido sono stati disciolti, o che si trovano in via di sviluppo. Queste lacune sono sempre disposte in modo abbastanza regolare, più o meno ravvicinate in serie, parallele alle lamelle stromatiche e in prossimità dei grani.

Pure numerosi sono i plastidi nei quali l'orientamento delle lamelle

stromatiche e dei dischi dei grani appare così alterato (fig. 10) da far perdere ai cloroplasti la loro fisionomia di organiti a strutture ben ordinate, quali si osservano nelle foglie sane, e da imprimere loro un aspetto più o meno disordinato, con grani che, nelle sezioni, appaiono orientati nelle più svariate direzioni.

Abbiamo già rilevato, nella precedente Nota (GEROLA *et al.*), come nei cloroplasti delle foglie sane siano quasi sempre presenti alcuni «globuli» molto scuri al ME. Nei cloroplasti di foglie virosate gli stessi globuli appaiono in maggior numero ed il loro aspetto è alquanto differente da quello ch'essi presentano nelle foglie sane, sia per la minore opacità al ME, come anche per la loro forma la cui sezione, anzichè rotonda, è più o meno elittica (figg. 1 e 4).

Non tutti i cloroplasti delle foglie virosate hanno caratteristiche abnormi, alcuni ve ne sono il cui aspetto è, almeno apparentemente, normale; merita peraltro rilievo l'osservazione che, in proporzione insolitamente elevata, i cloroplasti non deformi delle foglie virosate presentano strutture proprie di stadi molto giovanili, come se l'infezione virotica, pur non determinando in essi grandi alterazioni, ne abbia arrestato il processo di differenziazione (fig. 9). È anche da precisare che la localizzazione di questo tipo di cloroplasti, al pari di quanto si osserva nelle foglie sane, è molto accentuata nelle cellule profonde del mesofillo, in prossimità più o meno immediata delle nervature.

Localizzazione intracellulare del TMV. Nelle foglie virosate, siano esse già adulte e con evidenti sintomi macroscopici di virosi (ingiallimento, ecc.), siano esse giovanissime, quasi in gemma e non ancora evidentemente ammalate, il TMV si presenta sotto forma di spicole opache al ME, in parte isolate, in parte riunite in voluminosi ammassi. Quanto alla loro localizzazione intracellulare, tali spicole sono ubicate sempre nel citoplasma, quindi non nell'interno dei cloroplasti nè, si direbbe, necessariamente a loro contatto; sembra piuttosto che esse abbiano stretti rapporti con i granuli di Palade, ciò che del resto potrebbe apparire non evitabile data la loro localizzazione citoplasmatica (figg. 11, 12, 13, 14 e 15). L'osservazione merita tuttavia rilievo essendo i granuli di Palade caratteristici per la grande ricchezza di RNA. Nelle foglie adulte, d'altra parte, le spicole virotiche, pur essendo sempre circondate da granuli di Palade, sono sempre addossate ai plastidi (fig. 15), posizione che peraltro non sembra lasciare altre alternative, il citoplasma essendo ridotto ad uno stretto strato parietale addossante i cloroplasti alla membrana e ad essi quanto mai aderente. Che un rapporto di stretta vicinanza tra plastidi e ammassi di spicole non sia sempre indispen-

sabile sembra essere dimostrato dalle osservazioni fatte su foglie giovani, con cellule non ancora completamente accresciute, più ricche di citoplasma ricco, a sua volta, di RNA. In queste cellule gli ammassi di spicole sono di solito più o meno distanti dai cloroplasti (fig. 12) e attorniate da granuli di Palade, addensati più che non nelle rimanenti parti della cellula. La quantità di queste granulazioni avvolgenti le spicole va progressivamente riducendosi sia quando le foglie divengono via via più adulte, sia, nelle foglie già completamente sviluppate, a mano a mano che si accentua la loro depigmentazione di origine virosica. Nelle foglie adulte, specialmente nelle aree ingiallite, la diminuzione accentuata dai granuli di Palade è accompagnata da una diminuzione della evidenza delle spicole di virus, che, mentre nelle foglie giovani sono molto addensate e fortemente opache al ME, nelle aree gialle finiscono per divenire molto meno scure e, non di rado, invadono anche la cavità del vacuolo, forse per l'alterarsi della membranella tonoplastica (fig. 15).

Mitocondri. Nelle giovani foglie di piante virosate noi abbiamo spesso osservato mitocondri apparentemente non dissimili (fig. 13) da quelli delle piante sane; nelle zone giallastre (fig. 16) delle foglie adulte invece, ed ancor più in quelle completamente ingiallite, è solo con molta difficoltà che siamo riusciti a trovare mitocondri integri, o di normale struttura. È causa l'infezione virosica di significative alterazioni mitocondriali? Le nostre osservazioni ci inclinerebbero a rispondere affermativamente a questo interrogativo. Vogliamo tuttavia avvertire che si tratta non più che di una semplice impressione, derivata tuttavia dall'esame di copioso materiale. Le nostre osservazioni sono state più e più volte ripetute e confermate; riteniamo tuttavia che affermazioni definitive possono essere fatte solo dopo ulteriori studi più estesi e più minuziosi.

L'interesse di precisare le conseguenze dell'infezione virosica sull'infrastruttura dei mitocondri è legato alla questione fondamentale, e tuttora aperta, dell'importanza del ciclo di Krebs nelle foglie delle piante virosate. Secondo alcuni Autori (TAKAHASHI; FARKAS) infatti, la persistenza di tale ciclo condizionerebbe la possibilità moltiplicativa dei virus; i risultati di alcune recenti determinazioni manometriche (GEROLA e LAUDI) indicherebbero, per contro, come, almeno nelle aree in via di ingiallimento e in quelle gialle delle foglie mosaicate di Tabacco la respirazione sia per larga parte insensibile al malonato, ciò che sembrerebbe doversi attribuire ad una qualche alterazione dei sistemi respiratori legati proprio alla integrità strutturale dei mitocondri.

Discussione

Le nostre osservazioni al ME hanno permesso di meglio comprendere alcuni dei complessi rapporti che intercorrono tra virus e cellule ospiti, soprattutto in relazione ai problemi tuttora insoluti e già prospettati nella parte introduttiva di queste ricerche (Gerola *et al.*), quali gli effetti dei virus sulle strutture e sull'evoluzione dei cloroplasti, la localizzazione intracellulare dei virus, ecc.

Azione del TMV sulle strutture e sullo sviluppo dei cloroplasti. L'infezione virosica nel Tabacco sembra causare alterazioni tanto nei plastidi adulti, quanto in quelli in via di sviluppo. Nei plastidi già adulti esse si manifestano con la progressiva demolizione degli strati clorofillici, ciò che conduce alla dissoluzione dei grani; in quelli giovani, invece, la situazione patologica si manifesta col rallentamento, o addirittura con l'arresto dei processi di differenziazione. È peraltro interessante porre in rilievo come il blocco della differenziazione da virus decorra con modalità diverse da quelle che sono conseguenza di fenomeni di mutazioni capaci di provocare manifestazioni di albinismo (Wettstein; Lefort). È carattere proprio di questo ultimo caso, infatti, l'arresto dell'evoluzione del cloroplasto *in toto;* mentre l'arresto del TMV sembra concretarsi soprattutto con un estremo rallentamento di sviluppo limitatamente ai dischi dei grani. Per capire l'interesse di questa asserzione, va ricordato che i dischi dei grani sarebbero le uniche strutture plastidiali provviste di RNA; e che, d'altra parte, esse sembrano aumentare di volume in concomitanza ai processi di sintesi di clorofilla. Va anche ricordata l'opinione espressa da alcuni Autori (Leyon) secondo la quale i globuli opachi alle radiazioni elettroniche che si riscontrano nei cloroplasti, sarebbero in gran parte costituiti da clorofilla. Se ciò fosse vero (cosa che peraltro non sembra dimostrata) la grande abbondanza di globuli che noi abbiamo riscontrato potrebbe indicare che il virus non impedisce tanto la sintesi della clorofilla, quanto l'ordinata disposizione di questa nelle complesse strutture del cloroplasto.

Lo stesso ordine di fenomeni, intendiamo dire il rallentamento della differenziazione dei cloroplasti, è probabilmente suscettibile di concretarsi con altre anomalie strutturali di questi. Alludiamo particolarmente ai cloroplasti caratterizzati dalla presenza di numerose lacune ellittiche a stretto contatto con i grani. Non sarà inopportuno ricordare, a questo riguardo, come uno stadio particolare di sviluppo dei cloropla-

sti, stadio già anche da altri osservato (STUBBE e WETTSTEIN; GERO *et al.*) e probabilmente dovuto ad una accentuata alterabilità della stru tura plastidiale, sia contrassegnato dalla presenza di lacune più o me ordinate in serie nell'interno del plastidio. Ci si può pertanto prospe tare la possibilità che la frequente presenza di cloroplasti con numero lacune, nelle foglie virosate, sia da attribuire ad un arresto, definiti o temporaneo che sia, della differenziazione del plastidio e del quale plastidio viene colto in un atteggiamento morfologico solitamente f gace e che normalmente scompare con il completamento della differe ziazione dei grani. Va anche aggiunto che particolarmente sensibili tale azione di freno o addirittura di arresto della loro differenziazio appaiono essere i plastidi delle cellule più prossime alla nervatura, t i quali la frequenza di strutture giovanili, in foglie già adulte, è par colarmente elevata.

Oltre che con queste modalità, le quali si esplicano con alterazio che hanno rapporti più o meno diretti con la rallentata sintesi o l'a celerata demolizione della clorofilla, l'azione del TMV si manifesta a che in altro modo, ne è prova l'esistenza di cloroplasti che presenta un accentuato disordine nell'orientamento delle loro strutture intern

Localizzazione intracellulare del TMV. In nessuna delle numeros sime cellule esaminate noi abbiamo potuto trovare nell'interno dei cl roplasti formazione alcuna che facesse pensare alla penetrazione d virus in questi organiti. La letteratura è, su questo punto, molto scar o — se si eccettua quanto affermato da BRANDES e da MATSUI in u Nota preliminare, nella quale è indicata una localizzazione citoplasm tica del virus — le ricerche sin qui pubblicate non sembrano sufficie temente dimostrative, per la poca chiarezza dei preparati (BLACK *et a* SKOTLAND *et al.*) o perchè le osservazioni sono state compiute su clo plasti isolati (LEYON), ai quali è probabile siano rimaste aderenti alcu di quelle spicole che noi abbiamo osservato costituire degli ammas anche di notevole volume, in prossimità o a stretto contatto dei clo plasti. D'altro lato lo stretto legame topografico tra ammassi di spic identificabili con il TMV, e addensamenti di formazioni citoplasmatic ricche di RNA, quali sono i granuli di Palade, ci sembra degno di lievo, in quanto vari Autori (DELWICHE *et al.*; BASLER e COMMONE — in base soprattutto a ricerche mediante radioisotopi — ritengono c l'acido RNA dei microsomi delle cellule della pianta ospite abbia no vole importanza per le possibilità moltiplicative dei virus. Ciò potreb dar ragione anche del fatto che proprio nelle foglie giovani, che so particolarmente ricche di RNA citoplasmatico e nelle quali si ha

caratteristico addensamento di granuli di Palade attorno agli ammassi di spicole, si verifichi assai più che nelle adulte una intensa sintesi di nuove virusproteine (1); e che, inoltre, proprio in queste foglie si abbia l'arresto di sviluppo dei cloroplasti.

Le conclusioni cui ci sembra di poter pervenire in base alle osservazioni al ME concordano del resto con i risultati di talune indagini di carattere citochimico effettuate al MO (Gerola e Grilli), nel suggerire l'idea che le alterazioni dei plastidi siano essenzialmente secondarie, come conseguenza della presenza e soprattutto dell'attività moltiplicativa dei virus, i quali troverebbero nel RNA del citoplasma, e forse anche dei grani dei plastidi, il substrato necessario per la genesi di nuove virusproteine.

Queste conclusioni, la cui validità è quella consentita da osservazioni di carattere puramente morfologico, sono tanto più interessanti, in quanto concordano con le conclusioni di indagini effettuate al Tiselius (Wildmann *et al.*) dalle quali risulta che il progressivo aumento della quantità di virusproteine nelle foglie è parallelo ad una progressiva diminuzione di alcune frazioni di proteine citoplasmatiche, mentre non sembra legata a modificazioni apprezzabili delle proteine dei cloroplasti.

La diminuzione dell'opacità al ME delle spicole nelle aree gialle delle foglie virosate adulte appare in buona concordanza con le osservazioni di Zech al microscopio UV. Secondo Zech, infatti, proprio in queste aree si avrebbe una diminuzione dell'opacità dei corpi ad X a lunghezza d'onda di 2600 A, come conseguenza di una progressiva diminuzione del RNA delle virusproteine: processo che si conclude con la perdita del potere d'infezione delle spicole stesse e alla loro risoluzione in frammenti sempre più minuti.

L'azione del TMV nelle cellule non si limita certo a provocare modificazioni strutturali dei cloroplasti. È ovviamente prevedibile che l'attività della cellula ne sia in più punti toccata, e noi stessi abbiamo potuto constatare come nelle aree ingiallite delle foglie mosaicate di Tabacco, nelle quali la respirazione assume una certa insensibilità al malonato (Gerola e Laudi), si osservano con particolare frequenza mitocondri non perfettamente integri nelle loro caratteristiche strutturali.

---

(1) Secondo le ricerche di Zech di microscopia all'UV, la sintesi di nuovo RNA del virus si avrebbe solo nelle foglie giovani del Tabacco, per un periodo limitato.

Conclusioni e Riassunto

L'osservazione al ME di sezioni ultrasottili di foglie giovani e vi via più sviluppate di piante di Tabacco con evidenti sintomi di mosaicc ha permesso di riconoscere che il virus determina alterazioni cellula di vario tipo.

L'azione del TMV interferisce, in primo luogo, nei processi di sin tesi e di demolizione della clorofilla; conclusione che viene suggerit dalla grande frequenza tanto di cloroplasti giovani arrestati nel lor sviluppo proprio al momento del completamento della differenziazion dei grani — momento in cui sembra si verifichi la sintesi di nuova cl rofilla — quanto di cloroplasti già adulti con grani più o meno disciolt

Oltre a queste alterazioni di struttura dei plastidi verdi — in conco mitanza delle quali si constatano processi di ipertrofia di tutto il pla stidio e talora di abnorme accumulo di amido, ecc. — sono state osse vate anche deviazioni della stessa disposizione delle strutture plast diali, ciò che fa pensare che l'azione dei virus sia assai più profonda si eserciti sull'intera organizzazione dei plastidi.

Altri costituenti cellulari, oltre ai plastidi verdi, appaiono riser tire della presenza del virus; ne dà una prova esemplificativa il difficil riperimento, nelle aree gialle delle foglie virosate, di mitocondri a strut tura normale.

È stato infine constatato che il TMV ha una localizzazione pura mente citoplasmatica; quanto meno, l'osservazione ha valore in quest senso: che solo nel citoplasma il TMV è identificabile nella forma d spicole opache al ME, isolate oppure riunite in ammassi più o men notevoli, attorno ai quali, soprattutto nelle foglie giovani, vi è un ad densamento di granuli di Palade (2).

---

(2) Dopo la presentazione, in via preliminare, dei nostri risultati al *Symposiu* annuale della sezione lombarda della Soc. it. di Microbiologia a Varenna, nel giug 1959 e quando già era terminata la stesura del presente contributo, è apparso su « Pr toplasma » (vol. 51, fasc. 2) un lavoro di Wehrmeyer, nel quale sono riportate alcu considerazioni corrispondenti a quelle da noi espresse qui e nella precedente Nota (G rola).

BIBLIOGRAFIA (3)

Basler E. Jr. and Commoner B., 1956. — *The Effect of Tobacco Mosaic Virus Biosynthesis on the Nucleic Acid Content of Tobacco Leaf.* Virology, **2**: 13-28.

Delwiche C. C., Newmark P., Takahashi W. N. and Ng M. J., 1955. — *The relationship between tobacco mosaic virus and a accompanying abnormal protein.* Biochim. Biophys. Acta, **16**: 127-136.

Farkas G. L., 1957. — *Some Notes on the Metabolic Interactions between Host and Parasite.* Acta Biologica, **7**: 315-321.

Frey-Wyssling A. und Kreutzer E., 1958. — *Die submikroskopische Entwicklung der Chromoplasten in den Blüten von Ranunculus repens L.* Planta, **51**: 104-114.

Gerola F. M., 1959. — *Rapporti tra virus e cellule nelle piante erbacee.* Ann. Microbiol., **9**: 315-327.

Gerola F. M., Cristofori F. e Dassù G., 1959. — *Ricerche sulle infrastrutture delle cellule del mesofillo fogliare di piante sane e virosate di Tabacco (Nicotiana tabacum). A. Piante sane.* Caryologia, **13**: 352-366.

Gerola F. M. e Grilli M., 1955. — *Ricerche citochimiche in foglie di piante di patata var. Majestic, affette da « mosaico giallo ».* Rendic. Ist. Lombardo Sc. e Lett., Cl. Sc., **88**: 215-221.

—, 1955. — *Ricerche cariologiche su piante virosate di patata, var. Majestic.* Rendic. Ist. Lombardo Sc. e Lettere, Cl. Sc., **88**: 220-230.

Gerola F. M. e Laudi G. — In corso di stampa.

Leyon H., 1954. — *The Structure of Chloroplasts. IV. The development and structure of the Aspidistria chloroplast.* Exper. Cell Research, **7**: 265-273.

Steffen K. und Walter F., 1958. — *Die Chromoplasten von Solanum capsicastrum L. und ihre Genese. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Plastidenmetamorphose.* Planta, **50**: 640-670.

Stubbe W. und Weitstein V. D., 1955. — *Zur Struktur erblich verschiedener Chloroplasten von Oenothera.* Protoplasma, **45**: 241-250.

Takahashi W. N., 1948. — *The inhibition of virus increase by malachite green.* Science, **107**: 226.

Zech H., 1954. — *Morphologische und cytochemische Beobachtungen an Tabakmosaikvirusinfizierten Protoplasten von Nicotiana Tabacum.* Exper. Cell Research, **6**: 560-562.

Zech H. und Vogt-Köhne L., 1956. — *Untersuchungen zur Reproduktion des Tabakmosaikvirus. I. Elektronenmikroskopische Beobachtungen.* Exper. Cell Research, **10**: 458-475.

(3) Si rimanda alla nostra I Nota per la bibliografia colà riportata.

SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE XLV-XLIX

Foglie adulte di piante di Tabacco infettate con il TMV. Porzioni di cellule d mesofillo.

In tutte le figure il significato delle lettere è il seguente: a = amido; g = grani d cloroplasti; gl = globuli; gP = granuli citoplasmatici di Palade; m = mitocondri; = plastidi; sv = spicole di virus; v = vacuolo.

Tavola XLV

Fig. 1 — Cloroplasto con grani normali ad un estremità (a destra in basso) e gra notevolmente rigonfi all'estremità opposta, dove il sistema lamellare appare distanzia dalla membrana plastidiale per la presenza di abbondante sostanza stromatica (47.000 ×

Fig. 2 — Cloroplasto di aspetto ancora giovanile benché si trovi in foglie orm bene sviluppate. La sostanza stromatica è molto abbondante e i grani sono rigo (37.000 ×).

Fig. 3 — Cloroplasti rigonfi e riavvicinati fra di loro per ampio tratto (21.000 ×

Tavola XLVI

Fig. 4 — Cloroplasto di aspetto giovanile per l'abbondanza notevole di sostan stromatica, per il limitato sviluppo ancora del sistema lamellare e per i grani rigon Tutto il cloroplasto possiede grosse lacune e qua e là qualche globulo (53.000 ×).

Fig. 5 — Porzione di cloroplasto simile al precedente, ma quasi privo di lacune. centro vi è un grosso granulo di amido (47.000 ×).

Fig. 6 — Cloroplasto con grani (g) molto rigonfi e scarsamente visibili, attorni da numerose e piccole granulazioni scure. Verso il basso due grosse granulazioni amido (30.000 ×).

Tavola XLVII

Fig. 7 — Cloroplasto con sistema lamellare ancora incompletamente sviluppato grosse vescicole, soprattutto in prossimità dei grani (g) già formati o in via di for zione (70.000 ×).

Fig. 8 — Cloroplasto a sistema lamellare ormai bene differenziato benché scar mente opaco al ME. Nel suo interno granulazioni di amido (a) molto grosse (47.000

Fig. 9 — Cloroplasto a sviluppo molto arretrato, tipico per le cellule del par chima attorniante le nervature (41.500 ×).

TAVOLA XLVIII

Fig. 10 — Cloroplasto con grani molto rigonfi e con il sistema lamellare a decorso iuttosto disordinato (40.000 ×).

Fig. 11 — Spicole di virus (sv) riunite in un ammasso e circondate da addensa-ienti di granuli di Palade (gP) (85.000 ×).

Fig. 12 — Ammasso di spicole di virus (sv) attorno al quale sono addensati i gra-uli di Palade (gP). Nessun contatto diretto appare tra le spicole di virus e i plastidi non visibili in figura) (40.000 ×).

TAVOLA XLIX

Fig. 13 — Porzione di cellula di giovane foglia non ancora ingiallita. In essa sono uttavia già presenti le spicole di virus (sv). Il plastidio ha struttura apparentemente ormale, salvo che per la presenza di grosse granulazioni di amido. All'estremità del lastidio (p) alcuni mitocondri (m) (47.000 ×).

Fig. 14 — Ammasso di spicole di virus in stretta vicinanza di un plastidio (p) dal uale risulta separato tuttavia da addensamenti di granuli di Palade, che delimitano e spicole anche verso il vacuolo (gP) (57.000 ×).

Fig. 15 — Porzioni di cellule mesofillari di un tratto di foglia ormai ingiallita. I lastidi (p) hanno grani (g) rigonfi. Le spicole di virus (sv) sempre tra di loro ammas-ate, sono tuttora circondate da granuli di Palade (gP) presenti tuttavia in quantità nferiore a quanto rilevabile nelle foglie non ingiallite. Le spicole di virus hanno perso otevolmente la loro opacità al ME (37.000 ×).

Fig. 16. — Nelle porzioni ingiallite delle foglie adulte è molto frequente la pre-enza di mitocondri (m) nei quali la struttura appare piuttosto alterata (29.000 ×).

SUMMARY

Studies on the infrastructures of mesophyll cells of the leaves of healthy and TMV-iseased Tobacco plants (Nicotiana tabacum). B. TMV-diseased plants.

Young and gradually older leaves from Tobacco plants showing sharp symptoms t TM, have been studied by means of ultrathin sections observed at the electron mi-roscope, and it has been possible to observe that the virus causes several abnormalities n the host cells.

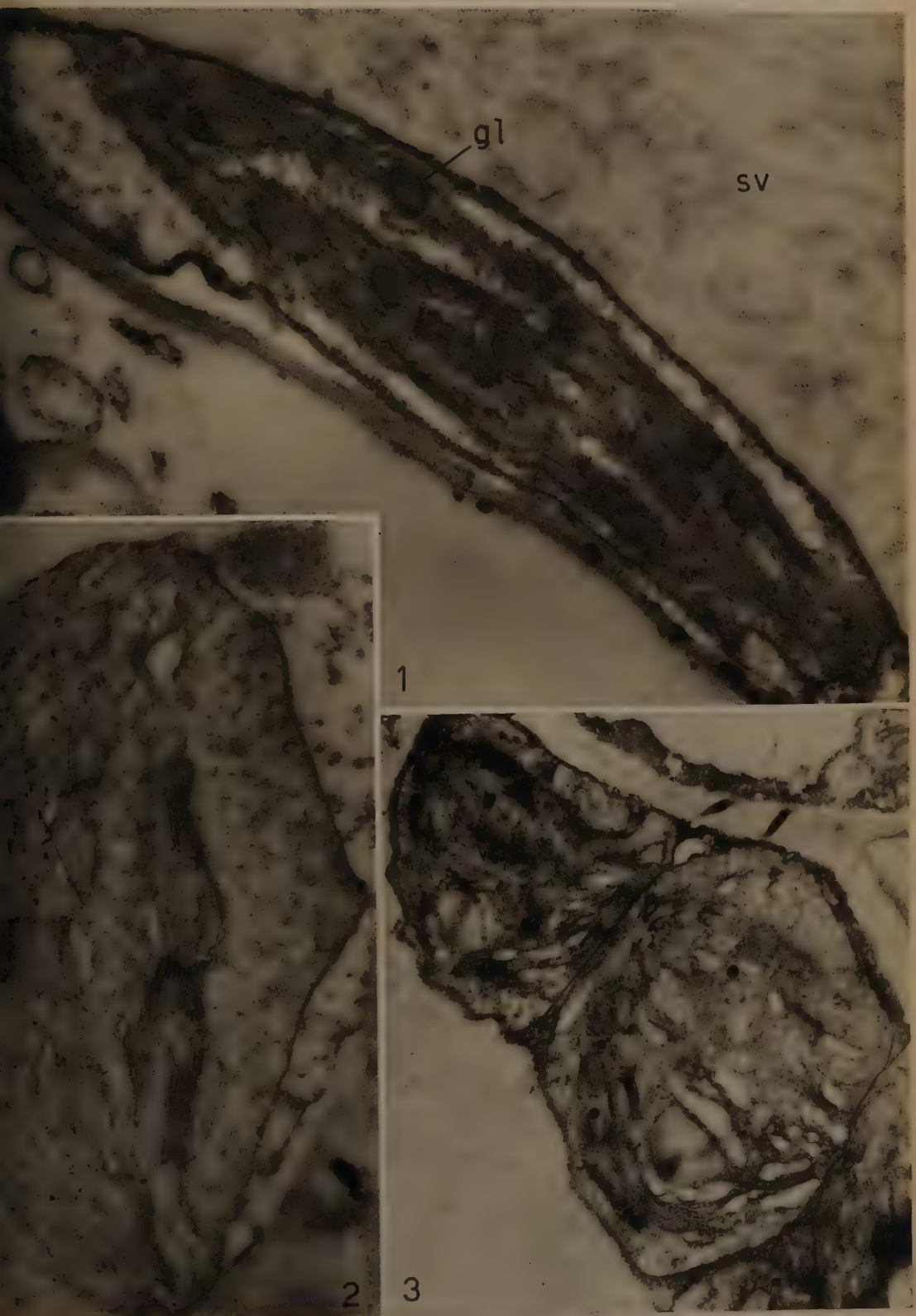
TMV affects the processes of synthesis and breakdown of the chlorophyll; this onclusion can be reached on the basis of the high number of young chloroplasts, whose levelopment has been blocked just during the final differentiation of the grana (and

therefore, as reported by the Authors, when chlorophyll is synthesyzed), together wit adult chloroplasts with more or less damaged grana.

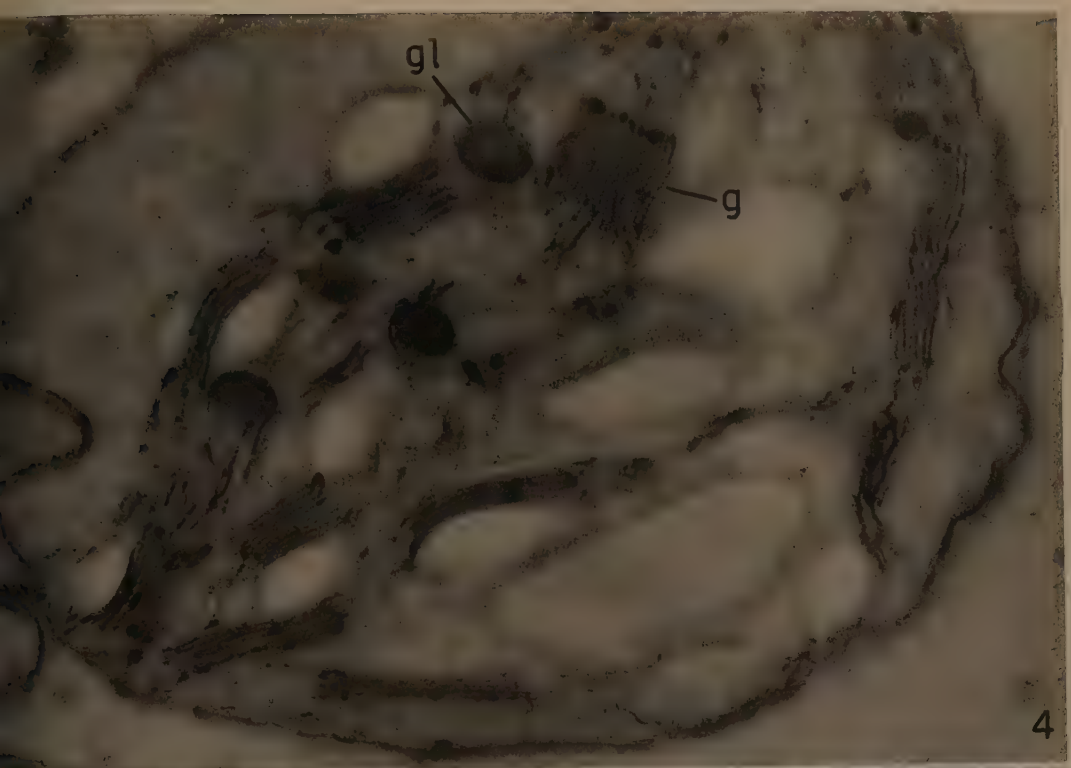
Besides such alterations of the green plastids, accompanied by hypertrophy of th plastids, abnormal starch storage, etc., deviations have been observed in the arrang ment of plastidial structures. This suggests a more intimate activity of the virus, whic may affect the whole organisation of plastids.

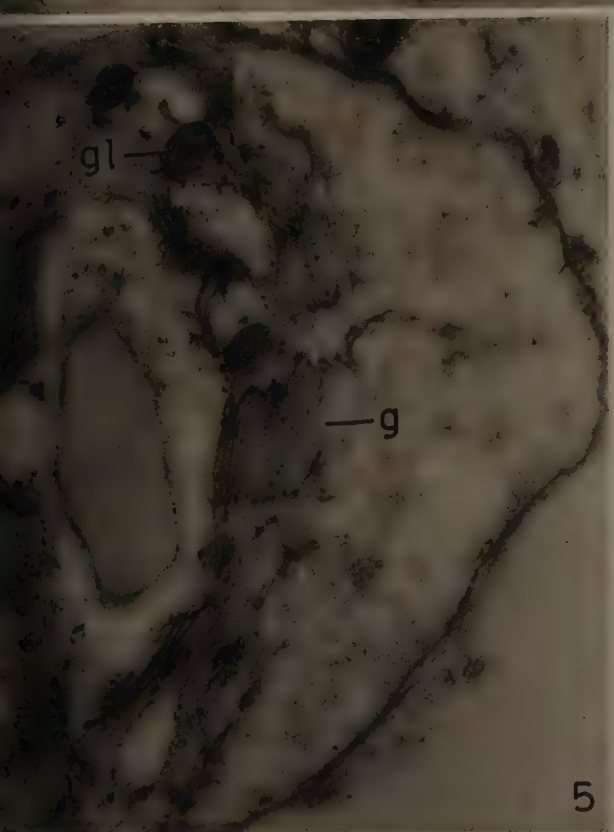
Some other cell constituents, besides the chloroplasts, are affected by the virus for example, it is very difficult to recognize normal mitochondria in the yellow area of diseased leaves.

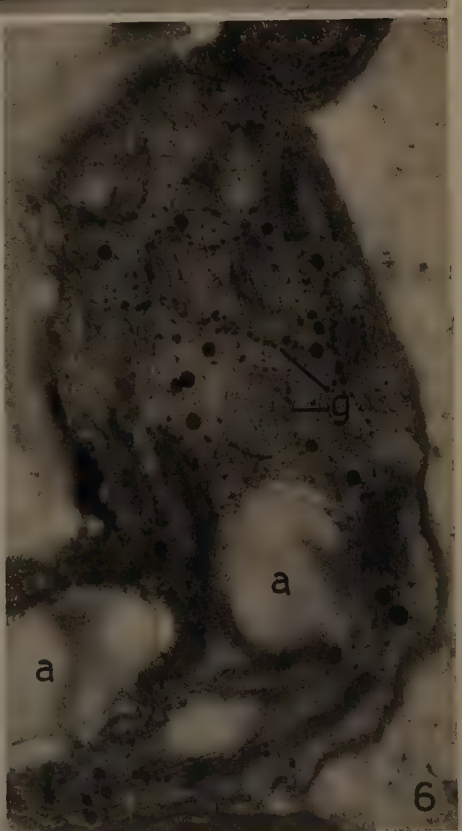
We have been able to observe that TMV is localized only in the cytoplasm; a least at the electron microscope we have been able to observe TMV only in the cyt plasm, in the form of dark rod shaped particles, separated or aggregated in more less conspicuous fibrous masses, around which Palade's granules are crowed, mostly the youngest leaves.



F. M. Gerola et al. - Infrastrutture del mesofillo di Tabacco.
B. Piante virosate.

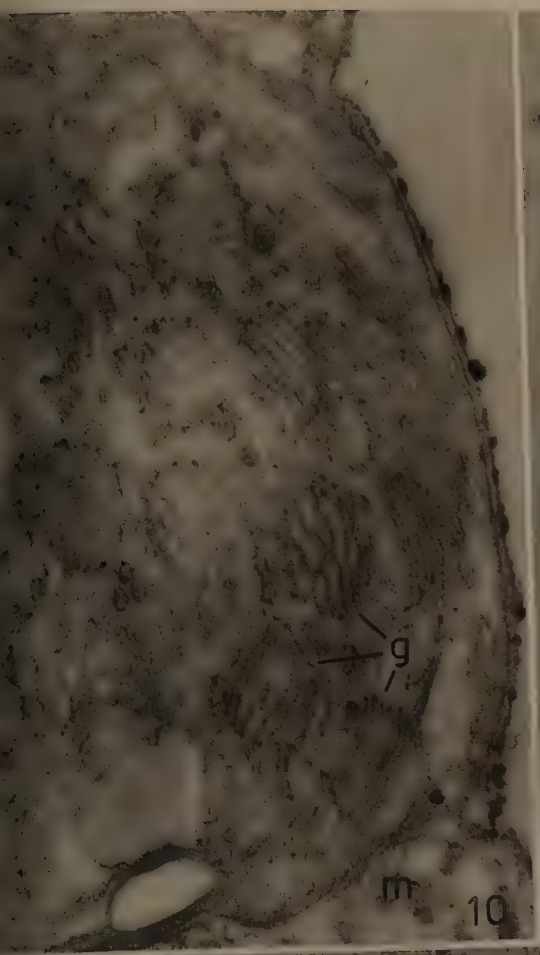


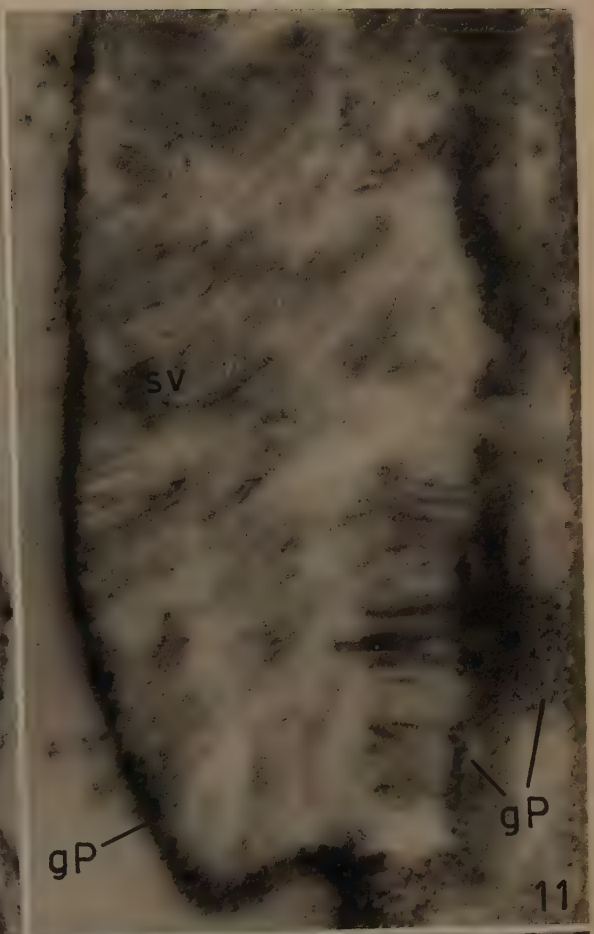


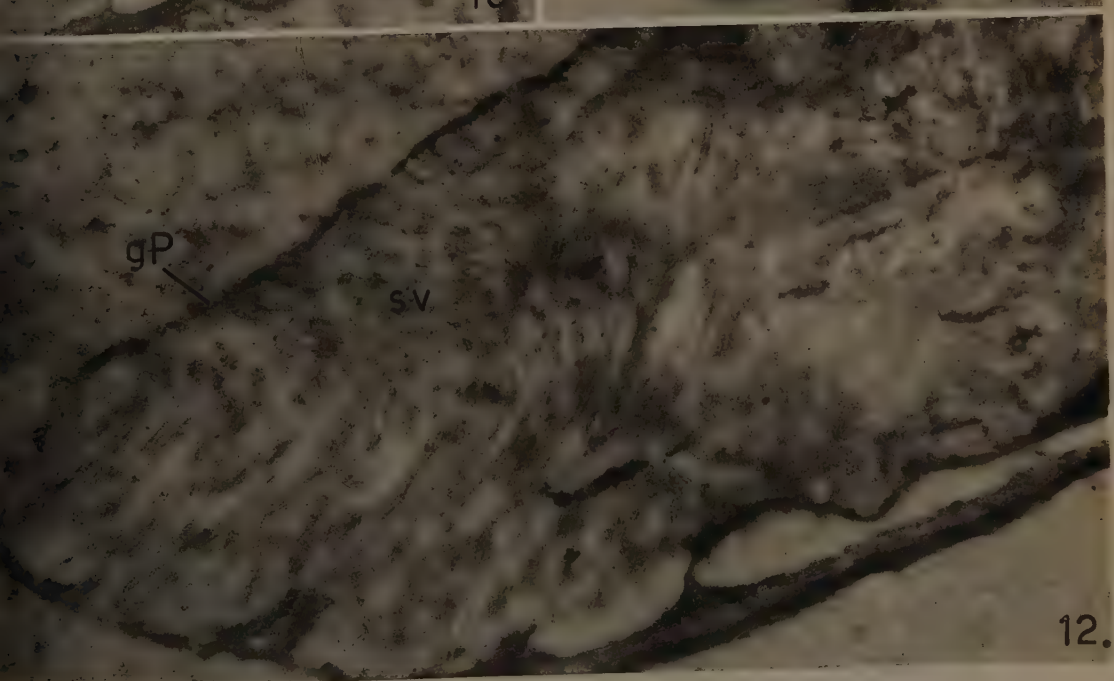


F. M. GEROLA et al. - Infrastrutture del mesofillo di Tabacco.
B. Piante virosate.

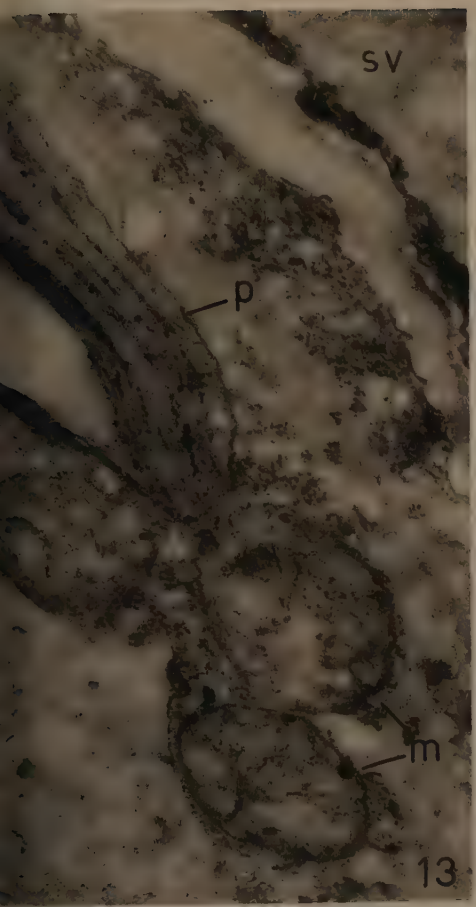
F. M. GEROLA et al. - Infrastrutture del mesofillo di Tabacco.
B. Piante virosate.

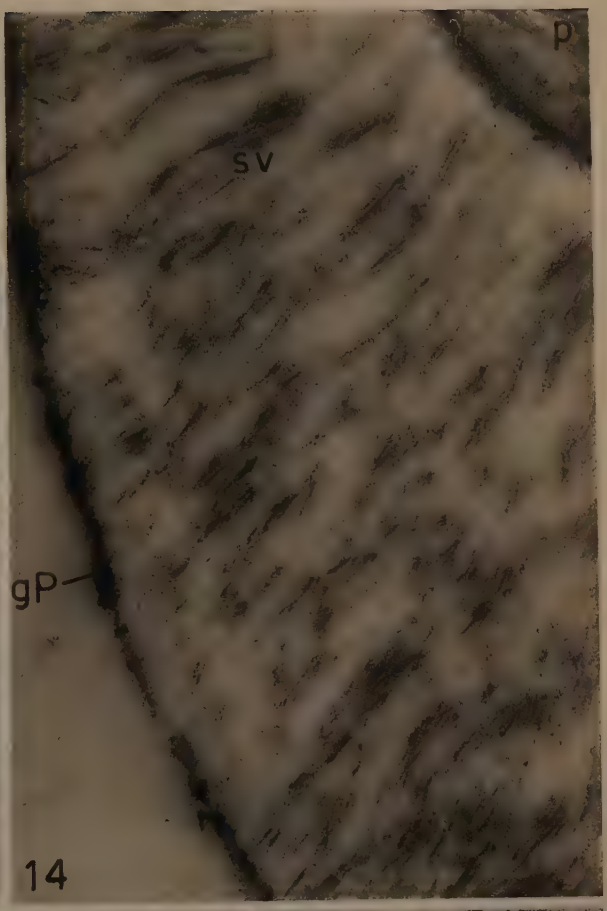


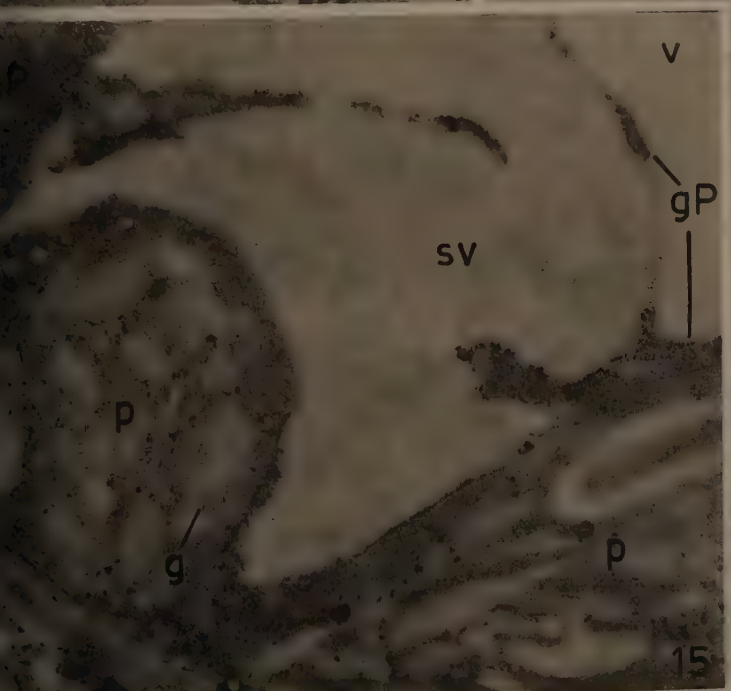




F. M. Gerola et al. - Infrastrutture del mesofillo di Tabacco.
B. Piante virosate.







F.M. GEROLA et al. - Infrastrutture del mesofillo di Tabacco.
B. Piante virosate.

SEED DEVELOPMENT FOLLOWING THE RECIPROCAL MATINGS BETWEEN THE DIPLOID AND THE AUTOTETRAPLOID STRAINS OF *SISYMBRIUM IRIO* VAR. *SUBTORULOSUM*

by

T. N. KHOSHOO and BALDEV RAJ

Botany Department, Panjab University, Chandigarh - 3, India

(with 26 text-figures)

Received: 4th January 1960.

Sisymbrium irio Linn. is a complex of four distinct cytological races and has been subjected to a biosystematic analysis (KHOSHOO, 1955; 1957*a-b*; 1958*a-c*; 1959*a-e*; 1960; KHOSHOO and SHARMA, 1959). The diploid race of this complex is considered to be a distinct variety, and has been tentatively named as, *S. irio* Linn. var. *subtorulosum* Khoshoo. Autotetraploid strain of this variety was raised in November, 1953 by colchicine-treatment. This strain was used, not only for the morphological and cytological comparisons with other members of the *irio* complex, but also, in a hybridization programme designed to elucidate the genome-relations of the various members of the complex (cf. KHOSHOO, 1960). Subsequently the autotetraploid strain was used for other purposes, particularly for raising autotriploid individuals, which in turn were employed for raising trisomic lines, after selfing or after crossing with the parental diploid.

During all these experiments it was experienced that, while the cross diploid × autotetraploid yielded invariably small, deformed or shrivelled and usually inviable seeds, the reciprocal (autotetraploid × diploid) yielded nearly 40-65% plump seeds. The present writers undertook to examine the possible cause of this differential seed-set following the reciprocal pollinations. This is the primary aim of the present work and, as such, no attempt has been made here to work out the details of embryogeny and such other details. Same methods were used as reported earlier by KHOSHOO and SHARMA (1959).

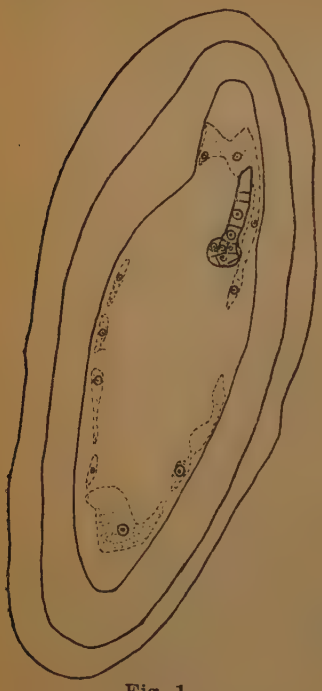


Fig. 1

Fig. 2

Fig. 3

Figs. 1-3: 2x × 2x (Fig. 1), 4x × 4x (Figs. 2-3). Figs. 1-2: Two days after pollination, showing globe embryo with nuclear endosperm. Fig. 3: Four days after pollination, showing heart-shaped embryo and cellular endosperm. Figs. 1-2 × 195; Fig. 3 × 89.

OBSERVATIONS

Normal Development.

The normal course of development in *Sisymbrium irio* tallies generally with the account given by HAKANSSON (1956) and RAJAN and AHUJA (1956) for Cruciferae in general, and *Brassica* in particular. A detailed description has already been given by KHOSHOO and SHARMA (1959) and only a very brief account will be given here. Furthermore, the course of development in the two parents (i. e. diploid and the autotetraploid) is extremely similar and these have, therefore, been treated together.

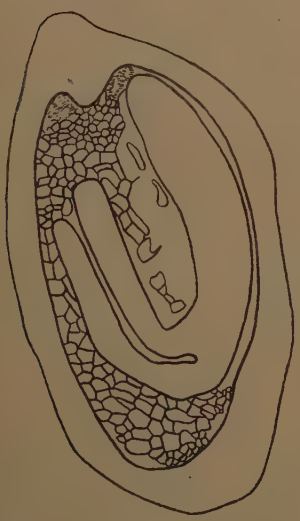


Fig. 4

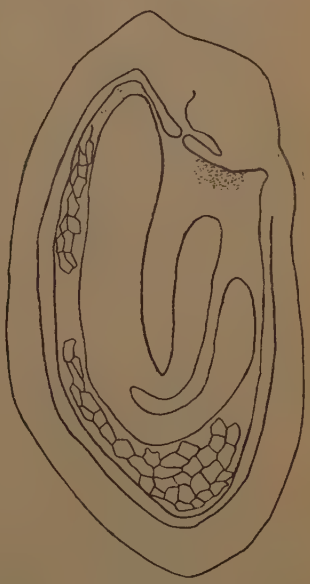


Fig. 5

Figs. 4-5: 2x × 2x (4), 4x × 4x (5). Six days after pollination, showing late walking-stick-shaped embryo. × 89.

The embryosac is of *Polygonum* type and the antipodals disorganise rather early. Pollen tubes reach the ovules in 8 hours, and by about 12 hours no ovules were found without a pollen tube. Fertilization takes place after 24 hours. Soon after the fertilization, the endosperm nucleus divides earlier than the zygote. On the second day almost all ovules

showed a small (3-13 celled) globe embryo (Figs. 1-2), suspended in th cavity of embryo-sac by 2-4 celled suspensor. At this stage the endos perm is nuclear. The nuclei are spread in a thin peripheral layer c cytoplasm. On the fourth day, the embryo is generally heart-shape (Fig. 3), or may be inverted-trapezium. At this stage endosperm i mostly cellular. Rarely, however, globe embryo may also be encoun tered, in which case the endosperm is still nuclear. Furthermore, b now, the differentiation between the basal and the apical endosperms i complete (cf. HAKANSSON, 1956).

Fig. 6

Fig. 7

Figs. 6-7: 2x × 2x (6), 4x × 4x (7). Magnified view of small portions of cellular endos perm, six days after pollination. × 390.

By the sixth day, the embryo is in the form of a walking stick o is somewhat horse-shoe shaped (Figs. 4-5). The endosperm is norma and cellular (Figs. 4-7). Finally, by 8 to 10 days the embryo enlarges becomes perfectly horse-shoe shaped (Figs. 8-9) and fills the entire cavity of the seed. By now the inner integument, the nucellus and the endosperm have been almost totally consumed. The mature embryo has an incum bent radicle and the seeds are plump (Figs. 10-11).

In comparison to the 1957-58 data (cf. KHOSHOO and SHARMA, 1959) the seed development in the present experiments is faster. On the fourth day in 1957-58, the embryo was only a large globe, but the presen account reveals that, in general, it was heart-shaped. Similarly al stages were ahead by about 2 days in the present attempt. This mino difference in the schedule of development is very likely due to the dif

ference in the weather conditions prevailing in the two years in which the two experiments were made.

Diploid × Autotetraploid.

After two days the embryo is in the form of a 2-10 celled globe with a suspensor of 3-4 cells. Endosperm is nuclear, which is, as usual,

Fig. 8

Fig. 9

Figs. 8-9: 2x × 2x (8), 4x × 4x (9). Ten days after pollination, showing horse-shoe-shaped embryo. × 89.

spread in a thin peripheral layer of cytoplasm (Fig. 12). On the fourth day the embryo is a large globe, or in rare cases it may be inverted trapezium (Fig. 13). The endosperm is nuclear. Some shrivelled seeds have also been noted at this stage. By about 6-8 days, the embryo in majority of the ovules is still globe-shaped, or may be inverted-trapezium or even heart-shaped (Fig. 14). The endosperm is still in the peripheral position and has a large central vacuole (Figs. 14-15). The endo-

sperm is crowded round the embryo as well. At this stage the endo sperm has rather dense and frothy (or much vacuolated) cytoplasm (Figs. 14-16, compare with Figs. 3-7). In such ovules the endosperm never becomes cellular. Furthermore, the vascular tissue and also cell of the chalazal region often become brownish. Generally such ovule have shrunk and have assumed irregular shapes. These are smaller in size than 2x × 2x, and much smaller than 4x × 4x, (compare Figs. 17

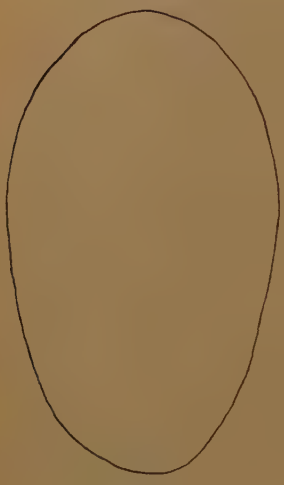


Fig. 10

Fig. 11

Figs. 10-11: 2x × 2x (10), 4x × 4x (11). Outline of the mature seed. × 89.

19 with Figs. 4-5). Very rarely, some ovules appear to be rather health with inverted-trapezium embryo and partially cellular endosperm. However, the proportion of shrivelled seeds becomes much greater by the eighth day, and by 10-12 days almost all ovules shrink and have become shrivelled and deformed (Fig. 20, compare with Figs. 10-11). During this process, the embryo in squeezed to death and so far very rarely viable seeds have been obtained in this cross.

Conclusions:

The principal feature of this combination is the very slow development of the endosperm and also of the embryo in comparison to the

parental combinations. This is clear from the fact that the embryo on the sixth day in 2x × 2x is at an early horse-shoe shaped stage (Fig. 4), but it has rarely progressed beyond the enlarged globe stage in 2x × 4x (Figs. 17-19). Furthermore, it never goes beyond the inverted-trapezium stage. The endosperm becomes cellular in the parental combination after the fourth day (Fig. 3), but in 2x × 4x even on the sixth day endosperm is nuclear (Figs. 14-16) and what is more important, it has become rather dense and frothy. Ordinarily, the appearance of vacuoles would be treated as an indication for the imminent wall-formation. However, wall-formation has never been found to occur in subsequent stages. Furthermore, such endosperm has never been found in the parental combinations and as such, appears to be a prelude to degeneration. In this respect the present case is similar to the 2x × 4x crosses in *Brassica* investigated by HAKANSSON (1956).

Autotetraploid × *Diploid.*

In this combination, the embryo is a globe of about 4 cells on the second day after pollination (Fig. 21). The suspensor is 3-celled. The endosperm is nuclear. On the fourth day, the endosperm is generally cellular and appears to be apparently healthy (Fig. 22). The embryo is a large globe or, in rare cases, it may be heart-shaped. By the sixth day, two types of ovules can be recognised. In some ovules the endosperm is rather darkly stained with globe embryo. These ovules are rather shrivelled and the embryos, which are in the process of being squeezed, would eventually die. Soon in ovules of this type, the endosperm is totally consumed. The globe embryo becomes sickly, whose cells are mostly empty. The cells of the inner integument become brownish and the ovules shrivel (Fig. 23).

The other type of ovules, however, contain cellular endosperm with a globe or a heart-shaped embryo.

On the eighth day the same course of events is seen, except that, firstly, the degenerating ovules have shrunk further, and there is no trace of endosperm and, secondly, in the near-normal ovules, the embryo has become inverted-trapezium or even heart-shaped. The endosperm in such ovules is cellular and apparently normal. At this stage in rare cases the embryo is still globe-shaped with nuclear endosperm (Fig. 24).

Subsequent development leads to small, shrivelled and deformed seeds from the first category (Fig. 25), while generally somewhat small

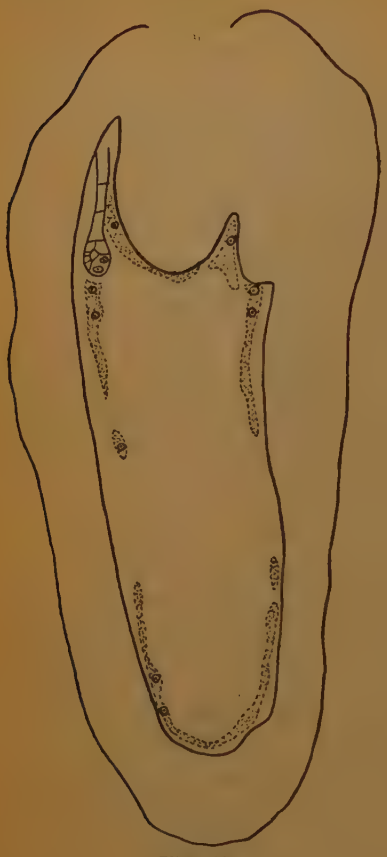


Fig. 12

Fig. 13

Fig. 14

Fig. 15

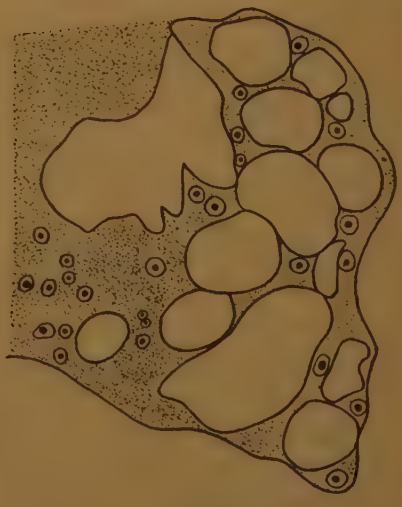


Fig. 16

Figs. 12-16: 2x × 4x. Two (12), four (13) and six (14-15) days after pollination, showing globe embryo with nuclear endosperm (12-13), followed by rather shrivelled ovule with dense and vacuolated endosperm (14-15). Fig. 16 is a magnified view of a portion of such endosperm. Figs. 12 and 16 × 195. Figs. 13-15 × 89.

ut plump seeds (40-65%) from the second category (Fig. 26). The latter ontain horse-shoe shaped embryos.

onclusions:

This combination differs from the parents, in being very slow in levelopment. Furthermore, by sixth day two types of ovules become ap-

Fig. 17

Fig. 18

Fig. 19

Fig. 20

Figs. 17-20: 2x × 4x. Six (17-18) and eight (19) days after pollination, showing shrivelled seed with degenerated endosperm and globe embryo. Fig. 20 shows outline of a mature seed obtained after this cross. × 89.

parent. In one type the endosperm does not develop beyond the initial stages and gets depleted. Coupled with this is the shrinkage, which progressively leads to their degeneration (Figs. 23, 25). In the second type, the development though slow, nevertheless, continues and normal horse-shoe shaped embryos are formed (Fig. 26). It is such seeds that give rise to the autotriploid plants. However, when this series of events is compared with that seen in 2x × 4x, two points become apparent. Firstly, almost all the ovules in 2x × 4x abort, while only 35-60% abort in 4x × 2x. Secondly, the events leading to abortion in the two combinations are different. In 2x × 4x the endosperm remains generally in peripheral po-

sition and never becomes cellular, but remains in rather dense and frothy state (Figs. 14-16), while in 4x × 2x it becomes cellular, but is unable to grow further. As such, the embryo is starved, and finally, due to shrinkage, such seeds abort (Fig. 25).

General remarks

It is a well known fact that crosses between diploids and their autotetraploids are usually difficult to make. These are usually unsuccessful when diploid is the mother, while are generally successful to varying degrees when tetraploid is the female parent. The only exceptions known to the writers are *Gallium mollugo* (Fagerlind, 1937) and *Populus tremula* (Johnsson, 1945), in which diploid × autotetraploid combination is more successful than its reciprocal. However, most of the cases follow the usual pattern in which the autotriploids result after autotetraploid × diploid cross (cf. Brink and Cooper, 1947; Stebbins, 1958). This is also true of most of the Crucifers like, *Brassica oleracea* (Howard, 1939; Hakansson, 1956), *Sinapis alba* (Olsson and Rufelt, 1948) and *Raphanus sativus* (Nishiyama, 1952). The present case also falls in this category. There is also the third category, in which both the reciprocal crosses (2x × 4x, 4x × 2x) are unsuccessful (cf. Brink and Cooper, 1947; Stebbins, 1958) and the notable examples among Crucifers are some *Brassica* species (Nishiyama and Inamori, 1953; Hakansson, 1956) and *Nasturtium officinale* (Howard, 1947).

The data on the diploid-autotetraploid crossing have been usually recorded after making only a macroscopic examination of the triploid seeds and counting the number of viable and inviable seeds. The embryological examination has so far been made in only 9 cases (cf. Hakansson, 1956; Stebbins, 1958). The present case is the tenth in this direction.

A study of most of these cases reveals that apparently the failure of such matings is due to three principal causes; the bursting of pollen tubes (*Datura stramonium*, Sansome, Satina and Blakeslee, 1942), or due to somatoplastic sterility and or improper development of vascular tissue (*Lycopersicon pimpinellifolium*, Cooper and Brink, 1945), or, as is usual, it is due to the endosperm malfunction (cases reviewed by Brink and Cooper, 1947 and Stebbins, 1958).

In the present case the pollen tubes have been seen to enter the ovules 8-12 hours after pollination and most of the ovules show proembryo development. This, obviously, indicates that the fertilization oc

Fig. 21

Fig. 22

Figs. 21-22: 4x × 2x. Two (21) and four (22) days after pollination, showing globe embryo with nuclear and cellular endosperm respectively. Fig. 21 × 195; Fig. 22 × 89.

curs in the present case. As to the abnormal development of the maternal tissue, the writers observed that the vascular tissue and the cells of the chalazal region in 2x × 4x, and the cells of inner integument in 4x × 2x become brownish and somewhat thickened in the later stages of degeneration. No other abnormalities were detected in the maternal tissues. The failure of seed formation in the two cross-combinations, primarily is due to either the defective endosperm formation (2x × 4x), or formation of a deficient endosperm (35-60% ovules in 4x × 2x). Evi-

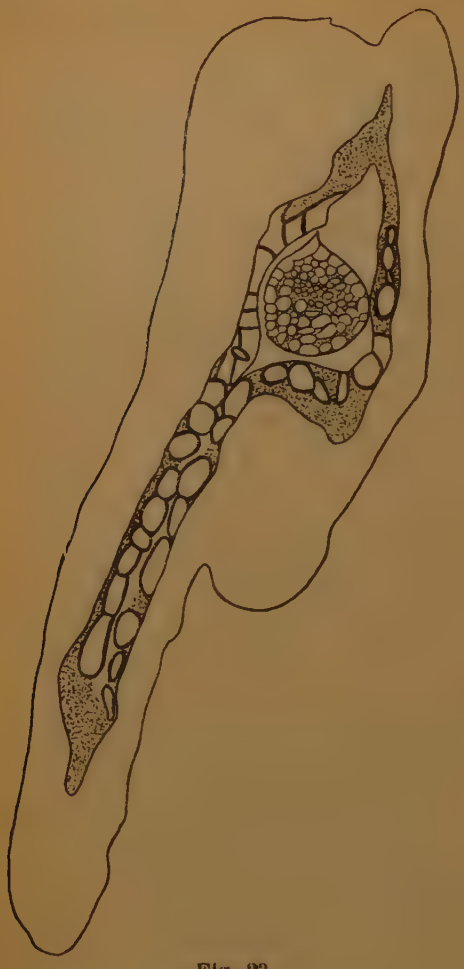


Fig. 23

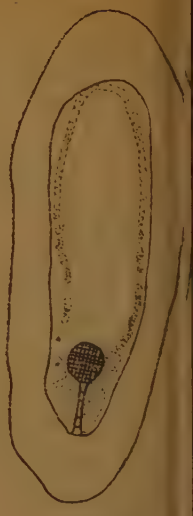


Fig. 24

Figs. 23-24: 4x × 2x. Fig. 23 is six da after pollination and shows shriv led ovule with brownish and thick ned integument. Fig. 24: Globe em bryo with nuclear endosperm, eig days after pollination. Fig. 23 × 19 Fig. 24 × 89.

dently, the present case belongs to the third category (namely, end sperm malfunction) mentioned above.

As to the cause of the endosperm malfunction in diploid-autot traploid matings, principally, three hypotheses have been suggeste from time to time. All these rest on the basic fact, that whenev autotriploids arise, they have a perfectly normal vegetative developmen Obviously, it means that the failure of such crosses is not due to aut triploid condition as such, but is the result of the disharmonies create in the immediate environment of the triploid embryo within the hybri

seed itself. The chief change in the immediate environment, is the change in the chromosome number of embryo and endosperm in relation to that of the maternal tissue. The three explanations suggested for the situation in such isogenic series (diploid and its autotetraploid), principally concern the new ratios created in the reciprocal cross-combinations.

WATKINS (1932) first suggested that the quantitative relation between endosperm and embryo is important. This has been elaborated further by HOWARD (1937, 1947). In the present case the ratio between the endosperm and embryo in both the parental combinations (2x × 2x; 4x × 4x) is 3 : 2 (= 1.5). In 2x × 4x, it is 4 : 3 (= 1.33), while in 4x × 2x, it is 5 : 3 (= 1.66). It is less (1.33) in the totally unsuccessful combination (2x × 4x), and greater in the partially successful one (1.66 in 4x × 2x), than that of the normal (1.5).

Conversely, COOPER and BRINK (1945) suggested that the effective ratio is the one between endosperm and the maternal tissue, because they believe that the role of embryo in seed failure, if at all, is secondary to the «larger and more active endosperm» in relation to maternal tissue. Such ratio in the parental combinations is 3 : 2 (= 1.5), while in 2x × 4x it is 4 : 2 (= 2), and in 4x × 2x it is 5 : 4 (= 1.25). The partially successful combination has a lower ratio (1.25) and unsuccessful combination has a higher ratio (2) than that of the normal (1.5).

The third and rather more accepted view is that of MÜNTZING (1933), who considers that the ratio between maternal tissue, endosperm and embryo is the determining factor. In the normal combinations it is 2 : 3 : 2 (= 1 : 1.5 : 1), while in unsuccessful combination (2x × 4x) it is 2 : 4 : 3 (= 1 : 2 : 1.5) and in the partially successful combination (4x × 2x) it is 4 : 5 : 3 (= 1 : 1.25 : 0.7). Evidently, the partially successful combination has a lower ratio (1 : 1.25 : 0.7) and the unsuccessful a higher (1 : 2 : 1.5) ratio than the normal one (1 : 1.5 : 1).

At present it is not possible to decide once for all in favour of any one of these hypotheses. Furthermore, one point is clear that so far no concrete evidence has been produced, even in the case of an isogenic series (diploid and its autotetraploid), as to how the alteration in the ratio between the various tissues of a fertilized seed affects its future course of development. The only one attempt in this direction has been made by COOPER and BRINK (1945). They feel that the «possible difference in physiological behaviour lies in the fact that as nuclear and cell volume are altered, the surface area of these structures does not change proportionately». Furthermore, «assuming that the surface-volume rel-

ations of nucleus and cell are important in certain metabolic processes the relatively large differential occasioned by a doubling of volum might well affect growth significantly. A balanced change in the chro mosome number, as in the tetraploid, does not affect seed developmen adversely. The incompatibility arises when the chromosome ratio be

Fig. 25

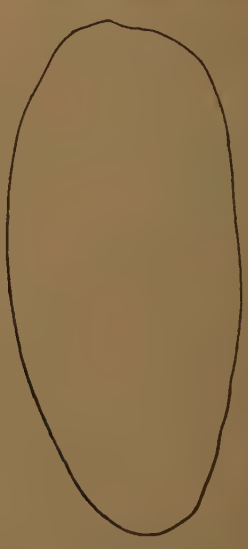


Fig. 26

Figs. 25-26: 4x × 2x. Outline of a plump seed (26) and a shrivelled seed (25) obtaine after this cross. × 89.

ween maternal tissue and endosperm is varied in either direction. I surface-volume relations in cell and nucleus are involved in seed abor tion, evidently it is the differential set up across the boundary betwee endosperm and endothelium which is important». However, thes authors themselves remark that «there is at present no clue to th reason why these alterations in chromosome balance between endosperm and maternal tissue should radically disturb seed development». Furth ermore, the present writers feel that as yet it is not possible to explai as to why the alteration in the ratios act differentially on the tw reciprocal crosses in the various materials.

From the foregoing account, one point, however, becomes clear. I relates to the primary importance of endosperm in seed development all other features (i. e. death of embryo, shrinkage of ovules etc.) ar

subordinate to it. In the present case the initial endosperm though slow in development is, nevertheless, nearly normal in the beginning. It contains nutrients that are sufficient for the initial embryo development. Soon there is degeneration or depletion of the endosperm. Once this phase starts, it continues at a rapid pace. The embryo is starved. The ovule as a whole increases in size, perhaps due to the stimulus brought by the pollen tube. The endosperm and embryo do not keep pace with such an increase. Finally at maturity due to drying there occurs shrinkage. During this process, the embryo, which though inherently viable, is squeezed to death.

A logical conclusion emerges, that the successful production of auto- or allotriploids (for that matter any hybrid) depends initially on the ability to produce an endosperm which is healthy and vigorous, and subsequently, on the ability of their genes to work harmoniously during the growth and development. The former appears to be the result of a very delicate physiological balance between the various tissues of a fertilized hybrid seed. Any change disrupts the balance and produces an endosperm that either degenerates or is unable to grow. With this, the normal nutrient mechanism is perhaps thrown out of gear.

As a corollary to the foregoing conclusion, is the fact that the endosperm malfunction has an evolutionary importance as an isolating mechanism. This is particularly the case in *S. irio* complex (KHOSHOO, 1959e; KHOSHOO and SHARMA, 1959). However, it must be emphasized that in *S. irio* complex such an incompatibility is actually «pseudo-incompatibility», because fertilization takes place in almost all combinations (cf. KHOSHOO and SHARMA, 1959) and that there is a distinct possibility of raising all the hybrids by embryo culture technique. This is also true for the present diploid-autotetraploid crosses and, for that matter, for all such isogenic polyploid series.

SUMMARY

Autotriploids of *Sisymbrium irio* var. *subtorulosum* are being employed in this department for raising trisomic lines of this variety. During these experiments it has been experienced that whereas, autotriploids are secured very rarely after diploid × autotetraploid cross, the reciprocal yields about 40-65% of such individuals. Therefore, an embryological examination of the two reciprocal combinations, in comparison to the parental ones, was undertaken.

The diploid × autotetraploid combination shows an initial normal but slow development; but 6 days after pollination most of the ovules show signs of endosperm degeneration, which never becomes cellular. The embryo is unable to grow and the seeds shrivel due to drying, with the result the inherently viable embryos are squeezed to death.

After the initial normal, but slow, development in the autotetraploid × diploid cross, we found two types of ovules by the sixth day. In about 35-60%, the endosperm is unable to grow further and in them the embryo remains starved. Ultimately such ovules shrink. However, in 40-65% ovules, the endosperm becomes cellular and develops rather very slowly, resulting in somewhat small, but viable seeds. It is from such seeds that the autotriploids arise.

The present observations have been discussed in the light of the previous work. It has been concluded that an important factor in disturbing the normal seed development in these crosses, is the change in the ratio of the chromosome numbers of maternal tissue, endosperm and embryo, in comparison to the parental combinations. How actually this disturbance disrupts the seed development, is as yet only a matter of conjecture. Furthermore, the production of triploids (whether auto- or allo-) depends initially on the ability to produce an endosperm which is healthy and vigorous and subsequently, on the ability of their genes to work harmoniously during the growth and development of the individual. Therefore, endosperm malfunction has an evolutionary importance as an isolating mechanism.

ACKNOWLEDGEMENTS

The writers are deeply grateful to Prof. P. N. Mehra for providing the necessary facilities. To Mr. S. K. Bhatia, thanks are due for his valuable help rendered during the preparation of this paper.

REFERENCES

Brink R. A. and Cooper D. C., 1947. — *The Endosperm in Seed Development*. Bot. Rev. 9: 423-541.

Cooper D. C. and Brink R. A., 1945. — *Collapse of seeds following the matings between diploid and tetraploid races of Lycopersicon pimpinellifolium*. Genetics. 30: 376-401.

Fagerlind F., 1937. — *Embryologische, zytologische, und bestäubungs-experimentelle*

Studien in der Familie Rubiaceae nebst Bemerkungen über einige Polyploiditäts-probleme. Acta Horti Bergiani, **11**: 195-470.

HAKANSSON A., 1956. — *Seed Development of Brassica oleracea and B. rapa after certain reciprocal pollinations.* Hereditas, **42**: 373-396.

HOWARD H. W., 1939. — *The size of seeds in diploid and autotetraploid Brassica oleracea L.* Jour. Genet., **38**: 325-340.

—, 1947. — *Seed size in crosses between diploid and autotetraploid Nasturtium officinale and allotetraploid N. uniseriatum.* Jour. Genet., **48**: 111-118.

JOHNSSON H., 1945 — *The triploid progeny of the cross diploid and tetraploid Populus tremula.* Hereditas, **31**: 411-440.

KHOSHOO T. N., 1955. — *Biosystematics of the Sisymbrium irio complex.* Nature, **176**: 608.

—, 1957*a*. — *Differentiation within the Tetraploid race of Sisymbrium irio complex.* Curr. Sci., **26**: 290-292.

—, 1957*b*. — *A Polyhaploid Plant of the Tetraploid race of Sisymbrium irio.* Jour. Hered., **48**: 238-242.

—, 1958*a*. — *Cytological Investigations on some Conifers and Natural Polyploids of some Angiosperms.* Doctorate Thesis, Panjab University, Chandigarh (India).

—, 1958*b*. — *Biosystematics of Sisymbrium irio complex. I: Modifications in Phenotype.* Caryologia, **11**: 109-132.

—, 1958*c*. — *Biosystematics of Sisymbrium irio complex. II: Morphology of the Races.* Caryologia, **11**: 133-157.

—, 1959*a*. — *Biosystematics of Sisymbrium irio complex. III: Cytology of the Races.* Caryologia, **11**: 297-318.

—, 1959*b*. — *Biosystematics of Sisymbrium irio complex. IV: Origin of Triploid, Hexaploid and Octoploid.* Caryologia, **11**: 319-329.

—, 1959*c*. — *Biosystematics of Sisymbrium irio complex. V: Mode of Pollination.* Caryologia, **11**: 330-333.

—, 1959*d*. — *Biosystematics of Sisymbrium irio complex. VII: Meiosis in Hybrids.* Caryologia, **12**: 98-103.

—, 1959*e*. — *Biosystematics of Sisymbrium irio complex. VIII: Isolating Mechanisms.* Cytologia, **24**: 330-334.

—, 1960. — *Biosystematics of Sisymbrium irio complex. IX: Genome Analysis.* Jour. Indian Bot. Soc., **39** (1). (*In press*).

KHOSHOO T. N. and SHARMA V. B., 1959. — *Biosystematics of Sisymbrium irio complex. VI: Reciprocal Pollinations and Seed Failure.* Caryologia, **12**: 71-97.

MÜNTZING A., 1933. — *Hybrid Incompatibility and the origin of Polyploidy.* Hereditas, **18**: 33-55.

NISHIYAMA I., 1952. — *Polyploidy Studies in the Brassiceae. I. The seed development in*

reciprocal crosses between diploid and tetraploid Raphanus. Mem. Res. Inst. Food Sci., Kyoto Univ., N. 3.

NISHIYAMA and INAMORI Y., 1953. — *Polyploidy Studies in the Brassiceae. III: Hybridization between diploid Brassica species (2n = 20) and their autotetraploids.* Mem. Res. Inst. Food Sci., Kyoto Univ., N. 5.

OLSSON G. and RUFELET B., 1948. — *Spontaneous crossing between diploid and tetraploid Sinapsis alba.* Hereditas, **34**: 351-365.

RAJAN S. S. and AHUJA Y. R., 1956. — *Seed development in Colchicine-induced autotetraploid of « Toria ».* Ind. Jour. Genet. Plant Breed., **16**: 63-76.

SANSOME E. R., SATINA S. and BLAKESLEE A. F., 1942. — *Disintegration of ovules in Tetraploid-Diploid and incompatible species crosses in Datura.* Bull. Torr. Bot. Club, **69**: 405-420.

STEBBINS G. L., 1958. — *The Inviability, Weakness and Sterility of Interspecific Hybrids.* Advances in Genetics, **9**: 147-215.

WATKINS A. E., 1932. — *Hybrid Sterility and Incompatibility.* Jour. Genet., **25**: 125-162.

RIASSUNTO

Mutanti autotriploidi di *Sisymbrium irio* L. varietà *subtorulosum* Khoshoo sono stati adoperati per ottenere linee trisomiche di questa varietà. Durante questi esperimenti fu osservato che mentre gli autotriploidi si ottengono molto raramente durante l'incrocio del diploide con l'autotetraploide, l'incrocio reciproco ne fornisce circa il 40-65%. Pertanto furono intraprese ricerche embriologiche sulle due reciproche combinazioni e sui genitori.

La combinazione diploide × autotetraploide mostra uno sviluppo iniziale normale, ma lento; 6 giorni dopo l'impollinazione la maggior parte degli ovuli mostra segni di degenerazione dell'albume, che non diventa mai cellulare. L'embrione è incapace di crescere e l'involucro dei semi si dissecca, cosicchè gli embrioni geneticamente vitali sono costretti a morire.

Nell'incrocio autotetraploide × diploide, dopo un inizio normale, ma lento, dello sviluppo, si trovano al sesto giorno due tipi di ovuli. In circa il 35-60%, l'albume è impotente a crescere ulteriormente e l'embrione rimane atrofico. Infine questi ovuli si disseccano. Nel 40-65% di ovuli, al contrario, l'albume diventa cellulare e si sviluppa per quanto molto lentamente; ne risultano semi alquanto piccoli, ma vitali. È da questi semi che nascono gli autotriploidi.

Le presenti osservazioni sono state discusse alla luce di precedenti lavori, e se ne è concluso che un importante fattore di disturbo per lo sviluppo normale dei semi in questi

incroci è il cambiamento nel rapporto dei numeri dei cromosomi dei tessuti materni, albume e embrione, in confronto alle combinazioni parentali. Come attualmente questi disturbi interrompano lo sviluppo del seme è ancora una questione di ipotesi. La produzione dei triploidi (sia auto- sia allo-poliploidi) dipende inizialmente dall'attitudine a produrre un albume sano e vigoroso, e in seguito dalla attitudine delle loro gene a cooperare armoniosamente durante l'accrescimento e lo sviluppo dell'individuo. Pertanto il cattivo funzionamento dell'albume ha un'importanza evolutiva come meccanismo isolante.

F. M. GEROLA e G. DASSÙ

VARIAZIONI DELLE INFRASTRUTTURE DEI CLOROPLASTI DI TABACCO *(NICOTIANA TABACUM)* DURANTE L'IMBIANCHIMENTO SPERIMENTALMENTE INDOTTO DELLE FOGLIE E IL LORO SUCCESSIVO RINVERDIMENTO

(con Tavole L-LIII) *

In redazione: il 20 Maggio 1960

Una delle più fondamentali questioni di morfologia cellulare è quella che riguarda la genesi dei plastidi. Si può dire che, sebbene tutte le ipotesi possibili sulla origine indipendente o mediata dei mitocondri e dei plastidi siano state prospettate, esse si basino su documentazioni che non sembrano definitivamente decisive a favore dell'una o dell'altra delle soluzioni prospettate, cosicché il problema è tuttora irrisoluto.

È da queste incertezze che hanno preso le mosse queste nostre ricerche, eseguite allo scopo di esaminare come si sviluppino i plastidi quando le foglie che li contengono siano poste in condizioni nelle quali normalmente, non si sarebbe verificato inverdimento alcuno. Lo spunto di tali indagini ci è stato offerto dalla possibilità di ottenere precocemente, mediante carenza nutrizionale, il totale imbianchimento della lamina fogliare (Mothes *et al.*, 1958) e di provocarne successivamente il reinverdimento. Il continuo controllo delle modificazioni strutturali determinate dall'una come dall'altra fase dell'esperimento ci avrebbe consentito osservazioni documentate sulle seguenti questioni: A) se l'imbianchimento della foglia provocato da carenza alimentare determini la completa scomparsa dei plastidi o, più semplicemente, una loro più o meno estrema regressione e, in ogni caso, con quali modalità; B) l'origine e le modalità di sviluppo dei plastidi che compaiono durante il reinverdimento, posto che il precedente imbianchimento sia accompagnato da una degenerazione irreversibile dei plastidi; C) se l'imbianchimento provoca una involuzione, non però la distruzione, dei plastidi preesi-

* Lavoro eseguito presso l'Istituto Botanico dell'Università di Milano; fotografie eseguite presso il Centro di Microscopia Elettronica del Politecnico di Milano.

stenti, quali residui strutturali essi conservino e come decorra il successivo loro ripristino.

Le ricerche al microscopio elettronico sono state integrate da osservazioni al microscopio ottico e al respirometro di Warburg, ma il risultato di questi due ultimi tipi di indagine sono esposti in un'altra Nota (Gerola e Grilli).

Materiali e metodi

Piante di Tabacco (*Nicotiana tabacum* var. Burley 24) sono state coltivate in serra, in vasi di piccole dimensioni, in modo che si venisse presto a istituire nelle piante una generica carenza alimentare. Ciò faceva sì che, a partire dalla terza o quarta foglia adulta, le lamine fogliari subissero un progressivo ingiallimento, seguito dalla completa decolorazione, o albicatura, delle foglie. Queste conservavano dimensioni piuttosto ridotte ma, a parte l'imbianchimento, non mostravano altri segni di degenerazione né di abscissione incipiente.

Piccoli pezzetti di lamina di foglie verdi, e poi in fase progressiva d'imbianchimento, sono stati fissati a freddo (3° C) per tempi variabili dalle 2 alle 24 ore, in soluzioni di acido osmico all'1%, tamponato a pH 7,2, secondo quanto indicato da Palade.

Successivamente le piante con foglie completamente albicate sono state trapiantate in vasi di maggiori dimensioni e, contemporaneamente, recise sopra una foglia interamente bianca, l'unica che venne conservata, tutte le altre essendo state eliminate, al pari di tutte le gemme ascellari. Da questo momento le piante sono state tenute in camera climatica nella quale si alternavano 16 ore di luce artificiale a 30° C e 8 ore di buio a 18° C. Già dopo alcuni giorni sono cominciate a comparire, nelle foglie albicate, delle chiazze sparse qua e là, e soprattutto in vicinanza della nervatura e verso la base fogliare, di tonalità dapprima gialle e poi sempre più verdi, sinché a poco a poco tutta, o almeno gran parte della lamina fogliare, è rinverdita, dapprima in maniera disforme e, alla fine, pressocchè uniformemente.

Anche di queste foglie in via di rinverdimento sono stati fissati, a successivi intervalli, dei piccoli pezzettini di lamina, seguendo la tecnica sopra indicata.

Il materiale così fissato venne successivamente disidratato nella serie degli alcooli etilici ed incluso in miscela di metacrilati (7.5 parti di butilmetacrilato e 2.5 parti di metilmetacrilato) mediante polimerizza-

zione per 48 ore a 60° C, in presenza di benzoilperossido all'1.5%, preceduta da una prepolimerizzazione a freddo con polvere di metacrilato (Gerola *et al.*, 1960*a*).

Il materiale così incluso venne successivamente sezionato all'ultramicrotomo (Philips o Cambridge) e studiato al microscopio elettronico (ME) Philips 100 MV.

Risultati

Foglie verdi. La struttura dei cloroplasti normali delle foglie completamente sviluppate è quella che già precedentemente abbiamo descritto (Gerola e Dassù). È soltanto da osservare che il ritardato sviluppo della lamina fogliare determinato dalla penuria alimentare della pianta ha portato con sè una precoce differenziazione dei cloroplasti che, infatti, sono già a «struttura adulta» in foglie ancora incompletamente sviluppate. In questi cloroplasti, inoltre, si osserva sempre qualche grossa granulazione di amido e, per lo più, il sistema lamellare è costituito da un fitto alternarsi di lamelle chiare e scure che riempiono tutto il plastidio, rendendo persino difficile distinguere i grani dalle lamelle stromatiche.

Foglie in via di ingiallimento. I fenomeni più evidenti che accompagnano il progressivo ingiallimento della foglia sono: l'impicciolimento dei cloroplasti nei quali vanno ingrossandosi uno o più globuli, che diventano sempre più opachi al ME e che vanno probabilmente interpretati come gocciole cariche di pigmenti gialli; il sistema lamellare, intanto, va sempre più perdendo la sua evidenza, sia per effetto di una riduzione del numero e della estensione delle lamelle, sia di una loro minore opacità al ME; contemporaneamente appaiono granuli di amido molto grandi o addirittura enormi (fig. 1).

Ben presto, mentre la grossezza dei granuli di amido e la quantità delle gocciole di pigmento (fig. 3) sono ancora aumentate, tutto il sistema lamellare si riduce a qualche gruppo di lamelle ravvicinate fra loro (fig. 6). I granuli d'amido, sempre presenti, vanno in seguito diminuendo di volume, sia in senso assoluto che relativamente al volume dei cloroplasti, esso pure in progressiva diminuzione. A questo punto si possono osservare con una certa frequenza, nei plastidi, numerose vescicole apparentemente vuote, delimitate da un leggerissimo straterello opaco e che sembrano formarsi a contatto delle lamelle in via di regressione (fig. 4).

Foglie giallo-pallide. Quando le foglie sono impallidite fino ad essere quasi bianche, non sono rari i plastidi fortemente vacuolizzati nei quali la sostanza stromatica appare molto ridotta, le lamelle sono completamente scomparse, manca qualsiasi traccia di amido e non sono rimaste nemmeno le gocciole di pigmento. È difficile dire se si tratti di plastidi alterati da qualche artefatto di fissazione o, come è forse più probabile, in stato di molta avanzata involuzione. Sono comunque più frequenti altri plastidi, nei quali persistono porzioni di lamelle (talora ravvicinate, altre volte lunghe e sottili), residui di sostanza stromatica apparentemente priva di struttura, una o più gocciole di pigmento e delle granulazioni che rappresentano quanto rimane dei grossi granuli di amido sebbene, a differenza di questi, esse siano un po' opache al ME (fig. 2).

Foglie bianche. Le caratteristiche descritte nello stadio precedente si fanno ancora più evidenti nei cloroplasti delle foglie completamente albicate. Il volume delle granulazioni di «amido» è ulteriormente ridotto, mentre ancor più vistose sono diventate le già grosse gocciole di pigmento. Il sistema di lamelle risulta ora costituito da qualche lamella ravvicinata, o addirittura da qualche lamella singola e sottile, mentre tutta la massa del plastidio appare occupata da una sostanza stromatica omogenea, scarsamente opaca al ME (fig. 8).

Rinverdimento di foglie albicate. Il rinverdimento delle foglie in precedenza albicate si verifica molto lentamente e non in modo uniforme nelle varie parti della foglia, nè in tutto lo spessore del mesofillo. Sono dapprima le zone confinanti con le nervature principali quelle che, di solito, assumono per prime tonalità giallo pallide per passare poi a toni gialli più marcati, giallo-verdi e, infine, decisamente verdi. Nelle zone internervali, dove pure si realizza a chiazze molto eterogenee, il processo d'inverdimento è caratteristicamente limitato dapprima a tanti piccoli punti, dai quali si estende a regioni progressivamente più ampie della lamina. In ogni caso questa rinverdisce dapprima verso la pagina superiore e solo molto più tardivamente verso quella inferiore, cosicchè la foglia può apparire già verde superiormente, e ancora bianca al di sotto. Tutto ciò fa sì che nella medesima sezione, e persino nella medesima cellula (fig. 12), si possono osservare, gli uni vicini agli altri, plastidi in stadi talora diversissimi di rinverdimento.

Foglie ancora bianche. Non si tratta, evidentemente, delle foglie giunte all'estrema fase di albicatura; ma delle parti di foglie che, pure appartenendo a piante poste da qualche giorno in condizioni favorevoli

al rinverdimento, non mostrano ancora alcun segno esteriore di ripresa; ciò che si verifica assai lentamente.

I plastidi conservano fondamentalmente le strutture descritte in precedenza per le foglie al termine del periodo di imbianchimento. Se ne differenziano tuttavia, tanto per l'assenza di qualsiasi traccia di granulazioni di amido o amido-simili (fig. 7) — che probabilmente vengono utilizzate subito nel periodo iniziale di rinverdimento — quanto per la maggior quantità di sostanza stromatica, finemente granulare, nella quale spiccano le grosse gocciole di pigmento e già si vede qualche tratto di lamelle (fig. 11). In taluni plastidi è caratteristica la presenza di vescicole o addirittura di «cavità», talora modeste sia per numero che per volume, talaltra molto grandi e numerose (fig. 12). In qualche plastidio tutta la sostanza stromatica appare molto rarefatta (fig. 5) o comunque meno opaca al ME. L'aspetto di altri plastidi, apparentemente privi di sostanza stromatica, è probabilmente dovuto ad artefatti di fissazione.

È assai caratteristico, nei plastidi di queste foglie, la non infrequente presenza di un piccolo ammasso di vescicole (figg. 5 e 7) che ricorda il «corpo vescicolare» da noi (Gerola, 1960; Gerola *et al.*, 1960*b*) descritto nei plastidi di piante eziolate di Pisello, o le formazioni ad esse analoghe osservate anche da altri Autori in plastidi eziolati (Hodge 1956; Hodge *et al.*, 1956; Lefort, 1959*a*; ecc.) o in mutanti clorotici e albini (Wettstein, 1957*a*, 1957*b*, 1959; Lefort, 1957; Lefort, 1959*b*). Quale sia l'esatto significato di queste formazioni, frequenti solo nei plastidi a sostanza stromatica molto scarsamente rilevabile al ME, è difficile dire. Potrebbe trattarsi d'una manifestazione di regressione avanzata, potrebbe trattarsi d'un primo segno di ripresa. Tenuto conto della fase sperimentale cui queste immagini si riferiscono — fase caratterizzata dalle condizioni favorevoli al ripristino d'una situazione normale da parte di cellule sofferenti e rese profondamente anomale — si sarebbe tentati di propendere per la seconda alternativa. Potrebbe trattarsi, cioè, di plastidi che hanno reagito alle mutate condizioni sperimentali col tentativo di rifacimento d'un nuovo sistema lamellare; tentativo che, peraltro, è stato parzialmente frustrato — o almeno così deviato da non potersi concludere in maniera normale — dalle condizioni ancora fortemente anomale in cui si trova il tessuto dell'intera foglia.

Altre formazioni cellulari di incerto significato — fuori dei plastidi pur non mancando nelle foglie in via di imbianchimento e in quelle verdi — appaiono con maggiore evidenza in questa fase dell'esperienza. Ricordiamo anzitutto alcuni corpi molto opachi al ME, localizzati più o meno

in prossimità dei plastidi e quasi sempre visibilmente dotati di una doppia membrana, la quale avvolge una sostanza omogeneamente distribuita e a struttura granulare-vescicolosa. Queste formazioni sono identiche a quelle che noi abbiamo già trovato nelle foglie adulte di Tabacco (Gerola *et al.*, 1960*c*) (fig. 2) e sembrano analoghe a quelle osservate da Leyon e Wettstein (1954) in prossimità dei cloroplasti di *Fucus*. Quale sia il loro significato è molto difficile dire; si può solo rilevare l'esistenza anche di altre formazioni le cui dimensioni ed il cui aspetto sono in qualche modo intermedie tra queste (fig. 5) e quelle di alcuni plastidi a sostanza stromatica rarefatta.

Altre formazioni d'incerto significato, queste pure non esclusive delle foglie albicate in via d'inverdimento e particolarmente frequenti nelle cellule parenchimatiche vicine alle nervature, sono taluni organuli che, per struttura, dovrebbero essere identificati come mitocondri (fig. 9) dai quali peraltro differiscono per le maggiori dimensioni e per le invaginazioni della membrana, talune delle quali sono così profonde da attraversare tutto o quasi tutto l'organulo (figg. 9 e 14).

Zone di foglie in via di evidente rinverdimento. È ovvio che, allorquando l'inverdimento delle foglie è così profondo da essere macroscopicamente riconoscibile dall'esterno, i processi microscopici di rievoluzione dei plastidi sono da tempo in atto. La cosa emerge già dalle osservazioni relative allo stadio precedente; essa, comunque, fa sì che, sebbene nelle medesime sezioni e persino nelle medesime cellule si trovino plastidi variamente evoluti, sia già piuttosto difficile rintracciare, in questa fase dell'esperienza, gli stadi iniziali nella formazione, da parte dei plastidi, del nuovo sistema di lamelle. Tale processo, comunque, ricorda da vicino quello osservato, in altre piante, per lo sviluppo normale dei cloroplasti (Wettstein, 1959; Gerola *et al.*, 1960*a*, 1960*b*; ecc.). Nei plastidi provvisti di sostanza stromatica in un particolare stato di apparente idratazione, si formano dapprima gli abbozzi dei grani, con dischi piuttosto rigonfi, e di lamelle stromatiche congiungenti i grani. Il sistema lamellare, come sembra essere la regola, tende a disporsi in strati che decorrono, nel plastidio, da una all'altra estremità, dove quasi sempre si osservano alcune piccole vescicole. Successivamente, il sistema lamellare assume maggiore sviluppo e una disposizione più regolare, con dischi dei grani non più rigonfi (fig. 10).

Inizialmente, tuttavia, il decorso delle lamelle non è sempre così regolare. Spesso, infatti, gli strati lamellari in via di formazione appaiono spostati lateralmente (fig. 3), in modo tale che le gocciole di pigmento

rimangono comprese entro il sistema lamellare. Questa connessione tra sistema lamellare in formazione e gocciole di pigmento, appare soprattutto evidente nei plastidi poveri di sostanza stromatica nei quali si direbbe anche che, contemporaneamente alla differenziazione delle lamelle si abbia un sensibile aumento di sostanza stromatica. La disposizione dapprima eccentrica, e talora ad andamento sinuoso (fig. 13), delle lamelle — peraltro riunite in strati abbastanza compatti — va in seguito acquistando maggiore regolarità. Lamelle stromatiche e grani assumono infine la normale disposizione da un'estremità all'altra del cloroplasto di cui vanno intanto occupando un sempre maggior spazio. Un certo rilievo merita l'osservazione che, spesso, le lamelle non sembrano continuarsi con la membrana plastidiale — agli opposti poli del plastidio — ma arrestarsi prima di venirne in contatto.

Pur rimanendo a lungo presenti, e incluse tra gli strati lamellari, le grosse gocciole di pigmento finiscono con l'impicciolirsi e col ritornare alla grandezza di globuli di dimensioni appena superiori a quelli normali. Frattanto tutto il plastidio diviene occupato dal sistema lamellare e riprende la sua funzionalità, come è documentato dal ripresentarsi nel suo interno di granuli di amido (fig. 15).

Discussione dei risultati

Lo studio al ME delle modificazioni strutturali dei cloroplasti durante l'imbianchimento sperimentalmente indotto di piante di Tabacco mantenute in carenza nutrizionale, ha permesso di rilevare un quadro che, pur avendo una propria fisionomia, ricorda per taluni aspetti le alterazioni dei plastidi osservate in piante « non normali », o perchè affette da virus, o perchè mantenute in condizioni di deficiente illuminazione, o perchè, infine, per mutazioni geniche divenute incapaci di sintetizzare clorofilla.

Un carattere che si osserva costantemente durante le prime fasi dell'ingiallimento della lamina fogliare provocato sperimentalmente, è costituito dalla presenza di un enorme granulo di amido; ciò che trova pieno riscontro con quanto abbiamo già avuto occasione di osservare e descrivere (Gerola, 1959; Gerola *et al.*, 1960*d*) nelle foglie di piante di Tabacco in via di ingiallimento come conseguenza di infezione virosica con TMV. Sembrerebbe derivarne la possibilità che l'inizio dei fenomeni

di regressione del plastidio sia accompagnata da un accentuato attenuarsi dei processi di demolizione dell'amido, non, invece, di quelli della sintesi di questo. L'ulteriore decorso dei fenomeni involutivi determinati da carenza alimentare procede con caratteristiche più peculiari. I plastidi, infatti, subiscono una progressiva diminuzione di volume e manca del tutto il rigonfiamento della sostanza stromatica, dell'intero plastidio, o almeno dei dischi dei grani, che è stato descritto per i cloroplasti delle foglie mosaicate e per i grani dei cloroplasti che si trasformano in cromoplasti (Steffen e Walter, 1958; Frey-Wyssling e Kreutzer, 1958).

Un altro carattere che non è stato mai descritto per questi ultimi tipi di involuzione, e che sembra caratterizzare la regressione del plastidio provocata da deficienza nutritizia, è dato dal comportamento dei granuli di amido che, mentre vanno subendo un progressivo impicciolimento, si fanno anche progressivamente più opachi alle radiazioni elettroniche. L'indagine compiuta al MO (Gerola e Grilli) ci ha consentito di constatare che, mentre divengono più opachi al ME, i granuli di amido perdono la capacità di dare sia la reazione dello iodio come anche il fenomeno della croce nera in luce polarizzata.

Nelle foglie ormai ingiallite, ed in quelle giallo-pallide, le infrastrutture plastidiali assumono caratteri che per più motivi ricordano quelli descritti per i plastidi di piante eziolate o genericamente incapaci della sintesi di clorofilla. La presenza di grosse gocciole di pigmento ricorda, inoltre, l'analogo accumulo di globuli osservato da Wettstein nei plastidi dei mutanti *xantha*-3 e delle piante eziolate di Orzo, anche se, a differenza di quanto è stato descritto per le piante di Orzo, nei plastidi delle foglie ingiallite per deficienza nutrizionale i globuli, anzichè numerosi e di dimensioni piccole o medie, sono pochi o pochissimi, peraltro molto grandi.

Un altro punto degno di un certo rilievo è costituito dalla perdita di opacità al ME della sostanza stromatica dei plastidi, perdita tanto più forte quanto più avanzato è il processo di albicatura. Si può trovare in ciò una analogia con quanto avviene, nella pianta eziolata, quando i proplastidi si evolvono a cloroplasti: l'incremento di sostanza stromatica non è proporzionato al loro aumento di volume, tanto che essi appaiono quasi vuoti. Si tratta probabilmente, in entrambi i casi, della manifestazione della scarsa efficienza del plastidio il quale, nel caso dei fenomeni involutivi, subisce una forte perdita di materiali costitutivi che, probabilmente, prima che la foglia muoia vengono fatti migrare verso il fusto.

Il fenomeno sembra arrestarsi solo con la completa demolizione del plastidio; in alcune foglie interamente bianche ed ormai in via di abscissione, infatti, noi abbiamo constatato che l'opacità dei plastidi si era così attenuata da essersi fatta quasi nulla, sebbene che, per le loro caratteristiche morfologiche, questi plastidi non sembrassero gran che dissimili da quelli, più opachi al ME, delle foglie completamente albicate ma non ancora mostranti sintomi di imminente abscissione.

La maggior affinità di struttura che i plastidi «albicati» per deficienza alimentare finiscono per assumere per i plastidi di mutanti albini piuttosto che per quelli che degenerano per cause patologiche, fa pensare che più di una degenerazione dei plastidi si possa parlare, nel caso qui studiato, di «sdifferenziazione», non peraltro a tal punto totale da raggiungere lo stadio di proplastidi caratterizzati da strutture molto simili a quelle mitocondriali. È tuttavia interessante rilevare come nelle cellule parenchimatiche attornianti le nervature, ed in esse soltanto, si trovino con una certa frequenza strutture di cui è problematico giudicare se siano mitocondri oppure proplastidi. Ma va anche detto che non meno problematico è il giudicare se tali strutture rappresentino le tappe finali di un processo di sdifferenziazione plastidiale o non piuttosto (e forse più probabilmente) plastidi la cui differenziazione è stata precocemente arrestata. A propendere per questa seconda interpretazione ci induce il fatto che plastidi molto incompletamente differenziati si trovano spesso, e proprio nelle cellule parenchimatiche attornianti le nervature anche in foglie adulte normali.

Che si tratti di fenomeni di sdifferenziazione, anzichè di degenerazione, lo dimostra il fatto stesso che essi sono reversibili. È sempre alla loro «ri-evoluzione», infatti, che si deve il reinverdimento delle foglie non a formazione ex-novo di altri plastidi. L'arresto dei fenomeni involutivi e la loro inversione, per cui i plastidi «sdifferenziati» si rievolvono nuovamente a cloroplasti normalmente forniti di grani e di lamelle stromatiche, sono processi che avvengono con scarsa prontezza e sono sempre preceduti da una fase di «attesa» piuttosto lunga. Ciò è vero in senso morfologico, non però funzionale giacchè, durante la pausa, vengono utilizzate le eventuali riserve ancora presenti nei plastidi (il granulo di amido scompare infatti completamente) e viene invece sintetizzata nuova sostanza stromatica. Se, come accade in taluni plastidi — la cui involuzione era forse arrivata a gradi più spinti — la nuova sintesi di sostanza stromatica è scarsa o ritardata, compaiono nel plastidio degli addensamenti di piccole vescicole, che ricordano i primi abbozzi dei

l'« ammasso vescicolare » descritto per le piante eziolate di Pisello (GEROLA, 1960; GEROLA *et al.*, 1960*b*) o delle formazioni ad esso omologhe (« prolamellar body » di HODGE, 1956 e di HODGE *et al.*, 1956, « Plastidenzentrum » di WETTSTEIN, 1959, ecc.). Quando, invece, l'aumento di sostanza stromatica è rapido ed intenso, ricompare subito un frammentario sistema lamellare che ricorda quello delle foglie in via di ingiallimento e quello dei mutanti xantha e albini.

BIBLIOGRAFIA

FREY-WYSSLING A. and KREUTZER E., 1958. — *The Submicroscopic Development of Chromoplasts in the Fruits of Capsicum annuum L.* J. Ultrastr. Research, **1**: 397-411.

GEROLA F. M., 1959. — *Rapporti tra virus e cellule nelle piante erbacee.* Annali di Microbiol., **9**: 315-327.

—, 1960. — *Azione della luce sullo sviluppo e la differenziazione dei plastidi di Pisello.* Nuovo Giorn. Bot. It., n. s., **66**: 506-508.

GEROLA F. M., CRISTOFORI F. e DASSÙ G., 1960*a*. — *Ricerche sullo sviluppo dei cloroplasti di Pisello (Pisum sativum L.). I. Sviluppo dei cloroplasti in piantine cresciute in condizioni di normale alternarsi di luce e di buio.* Caryologia, **13**: 164-178.

—, 1960*b*. — *Ricerche sullo sviluppo dei cloroplasti di Pisello (Pisum sativum L.). II. Sviluppo dei cloroplasti in piantine eziolate e loro modificazioni durante il successivo inverdimento.* Caryologia, **13**: 179-197.

—, 1960*c*. — *Ricerche sulle infrastrutture del mesofillo di piante sane e virosate di Tabacco. A. Piante sane.* Caryologia, **13**: 352-366.

—, 1960*d*. — *Ricerche sulle infrastrutture del mesofillo di piante sane e virosate di Tabacco. B. Piante virosate.* Caryologia, **13**: 367-378.

HODGE A. J., 1956. — *Effects of the physical environment on some lipoprotein layer systems and observations on their morphogenesis.* J. Biophys. Biochem. Cytol., **2**/II: 221-227.

HODGE A. J., MC LEAN J. D. and MERCER F. V., 1956. — *A possible mechanism for the morphogenesis of lamellar systems in plant cells.* J. Biophys. Biochem. Cytol., **2**/I: 597-608.

LEFORT M., 1957. — *Structure inframicroscopique des chloroplasts de certains mutants dépigmentés chez Lycopersicum esculentum.* C. R. Ac. Sc. Paris, **245**: 718-720.

—, 1959*a*. — *Sur la présence d'un centre plastidial dans les chloroplasts d'Elodea canadensis.* Rev. Gén. Bot., **66**: 461-465.

—, 1959*b*. — *Etude de quelques mutants chlorophylliens induits chez Lycopersicum esculentum Mill.* Rev. Cytol. Biol. Végét., **20**: 1-153.

LEYON H. und WETTSTEIN v. D. V., 1954. — *Der Chromatophoren-Feinbau bei den Phaeophyceen.* Zeitschr. Naturforsch., **9b**: 471-475.

MOTHES K. und BAUDISCH W., 1958. — *Untersuchungen über die Reversibilität der Ausbleichung grüner Blätter.* Flora, **146**: 521-531.

STEFFEN K. und WALTER F., 1958. — *Die Chromatophoren von Solanum capsicastrum und ihre Genese.* Planta, **50**: 640-670.

WETTSTEIN v. D., 1957*a*. — *Chlorophyll-Letale und der submikroskopische Formwechsel der Plastiden.* Exp. Cell Research, **12**: 427-506.

—, 1957*b*. — *Genetics and the submicroscopic cytology of plastids.* Hereditas, **43**: 303-311.

—, 1959. — *Development Changes in Chloroplasts and their Genetic Control.* In « Developmental Cytology », pp. 122-160, Academic Press, New York.

SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE L-LIII

TAVOLA L

Fig. 1 — Porzione di plastidio di foglia in via di ingiallimento. Il sistema lamellare è in via di riassorbimento, mentre sta aumentando di volume un grosso globulo (gl). Un granulo di amido (a) occupa la maggior parte del plastidio; (52.000 ×).

Fig. 2 — Plastidi di foglie durante il processo di imbianchimento della lamina. Il granulo di amido è ora molto ridotto di volume e opaco al ME (a); il sistema lamellare è rappresentato da qualche tratto di lamelle. È pure visibile una formazione a stroma molto compatto, delimitata da una doppia membrana (d); (24.000 ×).

Fig. 3 — Plastidio di foglia giallo pallida: il granulo di amido (a) è ancora molto grande; il sistema lamellare è molto ridotto, mentre molto voluminosi sono i globuli (gl); (34.000 ×).

Fig. 4 — Plastidio di foglia giallo pallida con il sistema lamellare che dà apparentemente origine a numerose vescicole; (45.000 ×).

TAVOLA LI

Fig. 5 — Porzione di cellula di foglia completamente albicata. I plastidi sono molto poveri in sostanza stromatica, hanno grossi globuli (gl) e numerose piccole vescicole talora riunite in un corpo vescicolare (cv); (17.000 ×).

Fig. 6 — Cloroplasti di foglie quasi completamente albicate, nei quali la sostanza stromatica e il sistema lamellare sono molto diminuiti. È ancora presente un grosso granulo di amido (a); (29.000 ×).

Fig. 7 — Porzione di cellula di foglia bianca, ma in via di inverdimento. Nei pla

stidi non vi è più l'amido, la sostanza stromatica è aumentata, e il sistema lamellare è tuttora rappresentato da qualche tratto di lamella. Sono presenti anche grossi globuli (gl) e qualche ammasso di piccole vescicole (cv). È visibile pure una parte di nucleo, delimitata da una doppia membrana, nella quale è osservabile il nucleolo (nu) e degli addensamenti di cromatina (cr); (15.500 ×).

Tavola LII

Fig. 8 — Plastidio di foglia albicata, in cui è in via di riassorbimento il granulo di amido (a); il sistema lamellare è rappresentato solo da qualche esile lamella; (31.000 ×).

Fig. 9 — Formazione a struttura intermedia tra quella dei plastidi e dei mitocondri, di cellula parenchimatica attorniante le nervature; (24.000 ×).

Fig. 10 — Cloroplasto di foglia in via di inverdimento, nel quale sono ormai visibili grani (gr) e lamelle stromatiche regolarmente disposti da una estremità all'altra del plastidio; (61.000 ×).

Fig. 11 — Porzioni di cellule di foglie a lamina ancora bianca, ma in via di rinverdimento. Nei plastidi, in cui la sostanza stromatica è sensibilmente aumentata, sono visibili globuli (gl) di pigmento e un sistema lamellare ancora molto primitivo; (22.500 ×).

Tavola LIII

Fig. 12 — Porzione di cellula di foglia in via d'inverdimento, nella quale si trovano del tutto vicini plastidi in stadi di sviluppo molto differenti, alcuni plastidi sono ancora molto arretrati, con grossi globuli (gl) e lacune nel loro interno, mentre altri (pl) sono già provvisti di un sistema lamellare notevolmente sviluppato; (39.000 ×).

Fig. 13 — Plastidio di foglia in via d'inverdimento, con sistema lamellare già bene sviluppato, ma ancora ad andamento piuttosto irregolare; (40.000 ×).

Fig. 14 — Porzione di cellula parenchimatica vicina alla nervatura con alcune formazioni a struttura intermedia tra quella dei proplastidi e quella dei mitocondri; (17.000 ×).

Fig. 15 — Plastidio di foglia rinverdita con sistema lamellare molto sviluppato e bene ordinato. È di nuovo presente un granulo di amido (a); (45.000 ×).

SUMMARY

Structural changes in Tobacco chloroplasts during starvation induced whitening followed by recovery.

Accelerated whitening through starvation, and successive recovery of the original

green color were induced in Tobacco plants. Electron microscopy investigation at differer stages of whitening and recovery showed that:

1. Whitening is accompanied at first by the appearence of a large starch granu in the chloroplast, then by the progressive desappearence of the lamellar system an its substitution with a limited number of large globules of pigment. These modification are reversible.

2. The recovery of the green color is never accompanied by « ex novo » formatio of chloroplasts, but, rather, it is a consequence of the reappearence of the lamella system in the old chloroplasts, in which at first the starch granules, then the pigme globules desappear, while new stromatic substance is built up.

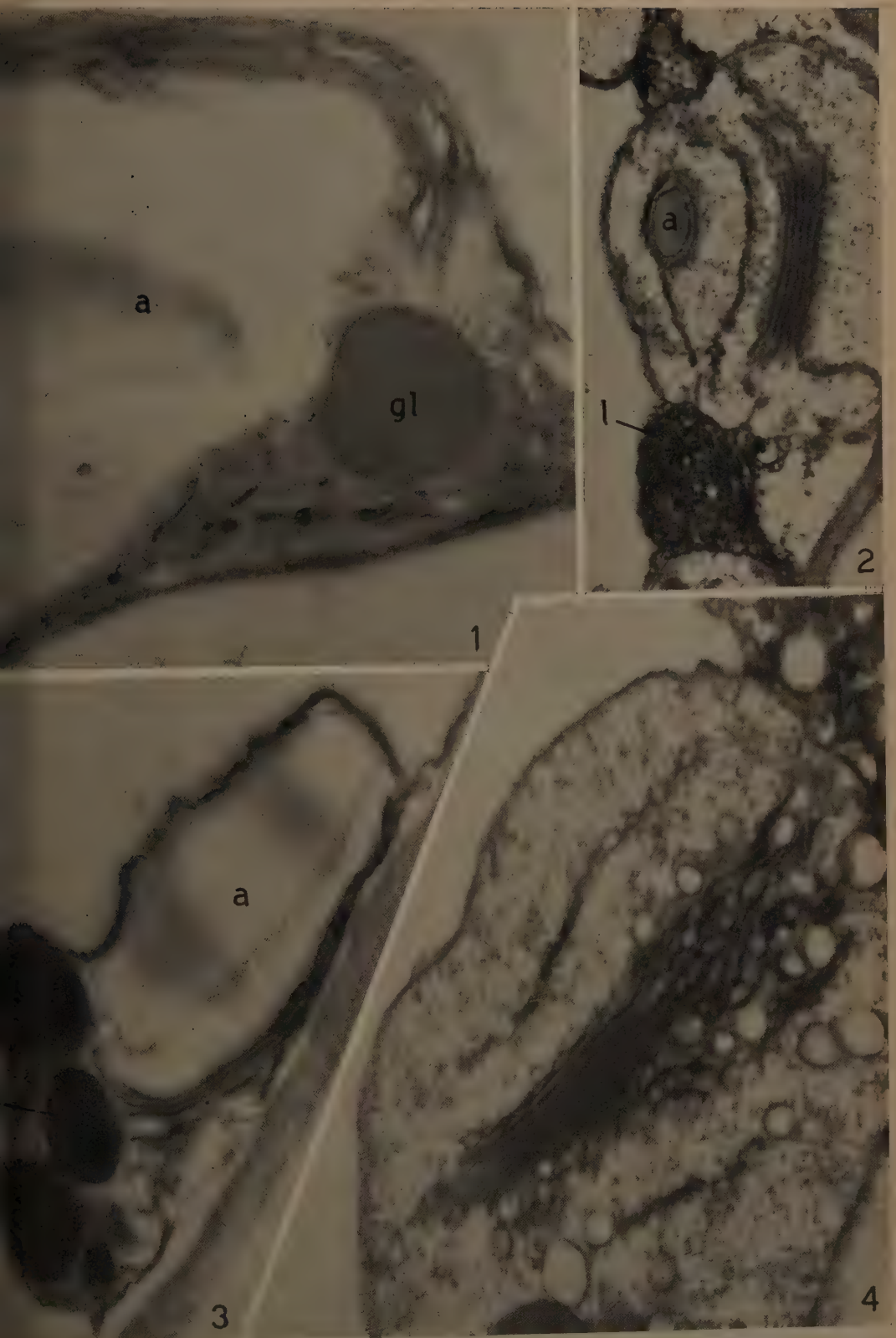
RIASSUNTO

In piante di Tabacco vengono successivamente indotti un processo di precoce in bianchimento delle foglie (come effetto di carenze alimentari) ed un successivo process di reinverdimento.

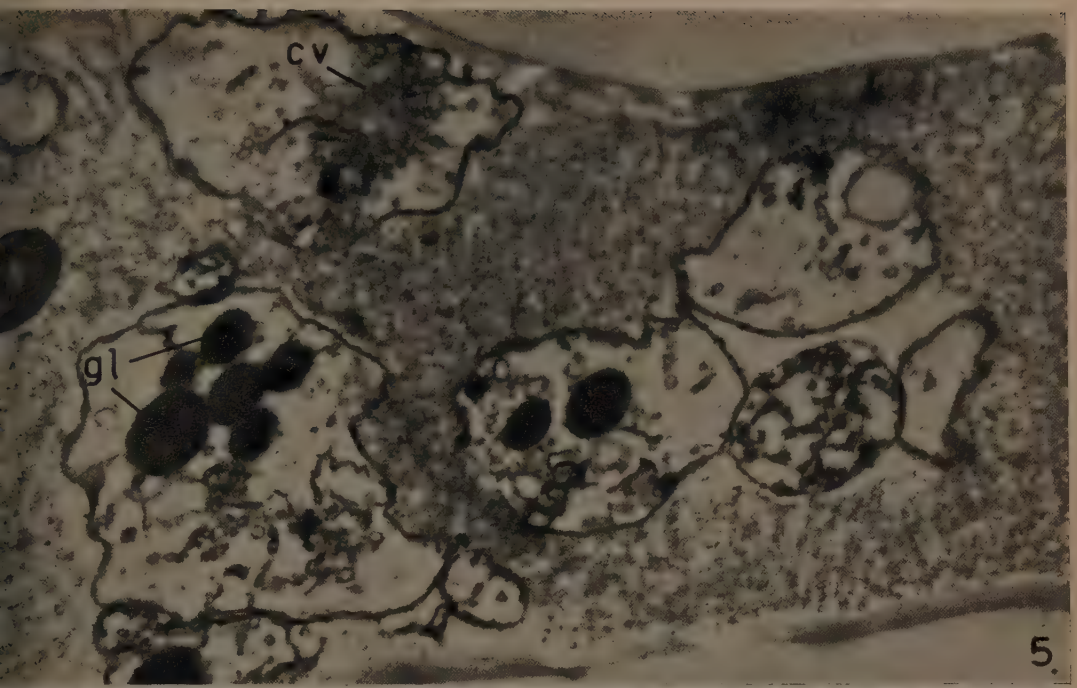
L'esame al microscopio elettronico delle lamine fogliari durante le successive tapp dell'imbianchimento e reinverdimento ha permesso di riconoscere che:

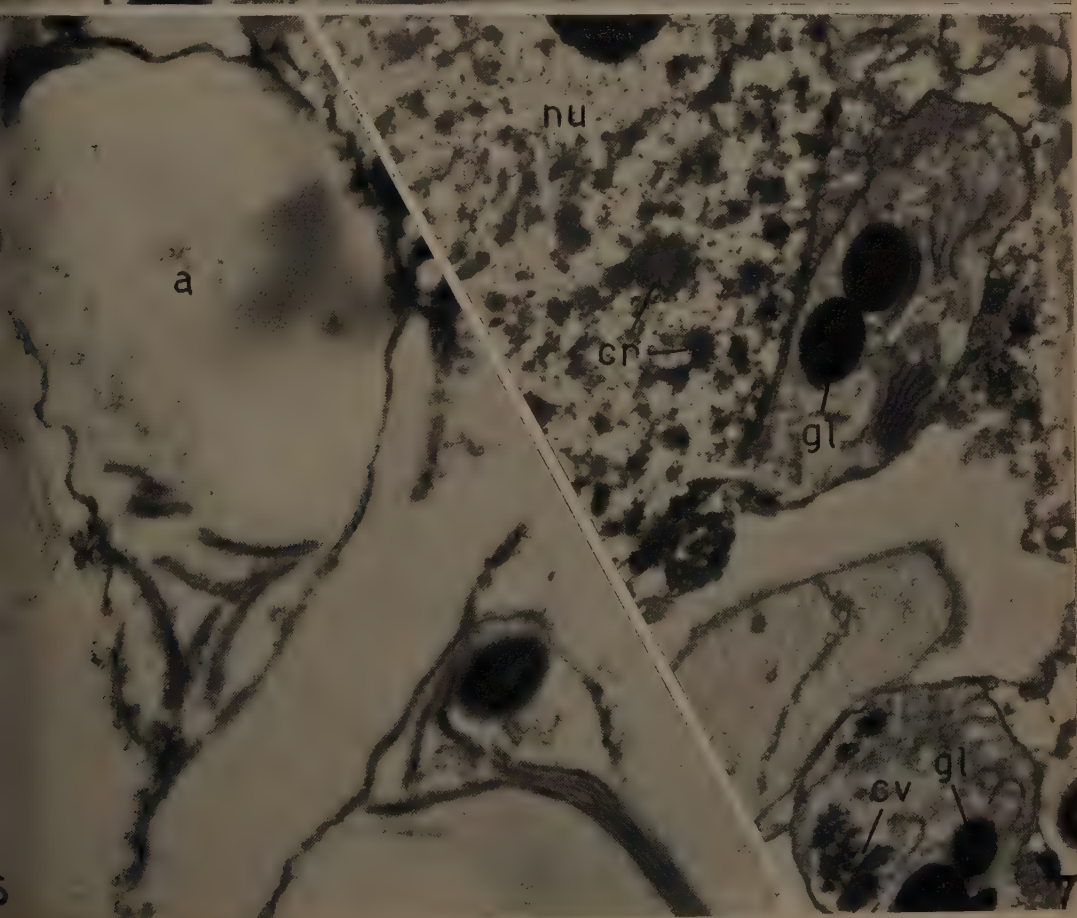
1. La decolorazione della foglia è accompagnata dapprima dalla comparsa di u grosso granulo di amido nel plastidio e, successivamente, dalla progressiva scompars del sistema lamellare che viene a mano a mano sostituito da depositi di pigmento sott forma di pochi e grossi globuli. Tali modifiche sono reversibili.

2. Il reinverdimento della lamina non è mai accompagnato da formazione *ex nov* di plastidi, ma è dovuto al riformarsi di un sistema lamellare nei plastidi in precedenz regrediti, nei quali vanno intanto riducendosi, fino a quasi scomparire, i globuli d pigmento. La ricomparsa del sistema lamellare nei plastidi è preceduta dalla complet utilizzazione di ogni riserva (scomparsa dei granuli di amido) e dalla sintesi di nuov sostanza stromatica.

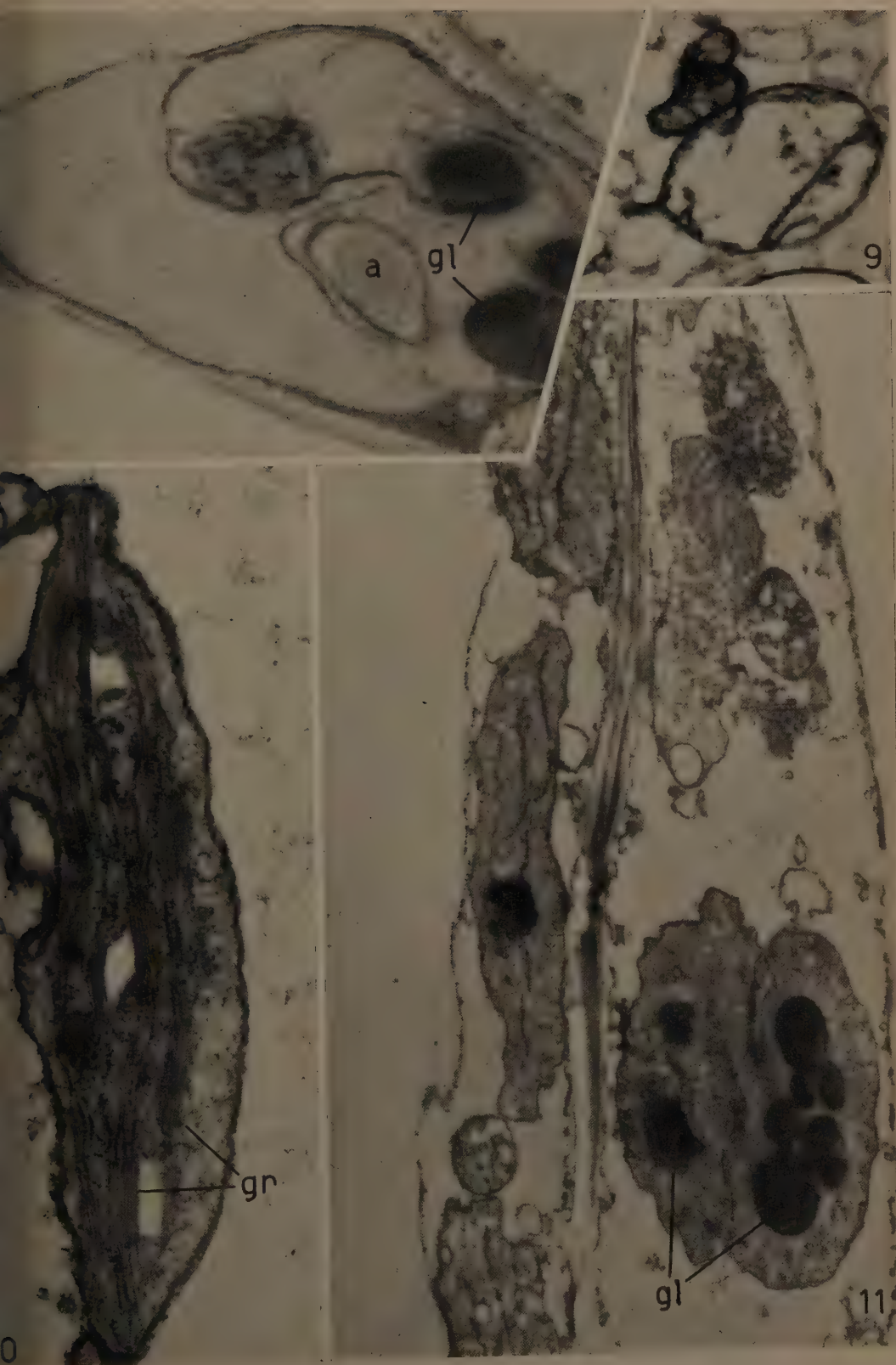


GEROLA e G. DASSÙ — Variazioni delle infrastrutture dei cloroplasti del Tabacco.

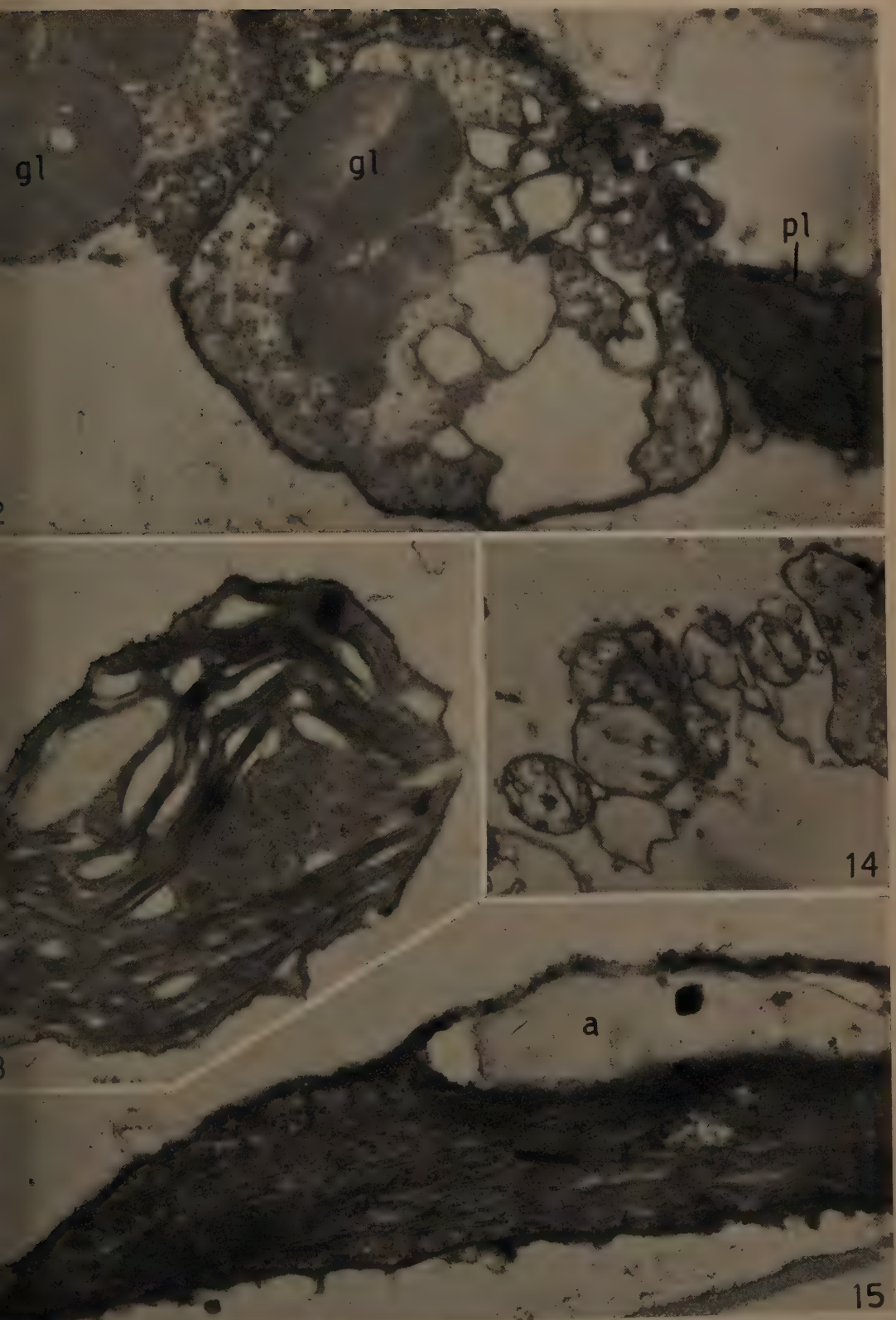




Gerola e G. Dassù — Variazioni delle infrastrutture dei cloroplasti del Tabacco.



Gerola e G. Dassù — Variazioni delle infrastrutture dei cloroplasti del Tabacco.



. Gerola e G. Dassù — Variazioni delle infrastrutture dei cloroplasti del Tabacco.

COLCHIPLOIDS OF *DOLICHOS LABLAB* L.

by

NIRAD K. SEN and K. M. MARIMUTHU

(with Plate LIV)

Received: 4th October 1959.

Introduction

Dolichos Lablab Linn. of the family Leguminoseae is cultivated throughout India, both as a field and a garden crop. The plants are mainly cultivated for fruits and seeds though it is also used as a fodder and green manuring crop. Evidences indicate that it originated in India. It is a perennial twining or creeping herb generally cultivated as an annual. A few varieties are bushy, prostrate or semierect.

There are two distinct varieties: var. *typicus* commonly grown in gardens and var. *lignosus* grown as a field crop. The variety *typicus* is a perennial twining herb though cultivated as an annual, while the variety *lignosus* is more of annual habit. They are further distinguished by the manner of attachment of the seeds. In *typicus,* the longer axis of the seed is parallel to the suture and in the field variety it is at right angles to it.

In both the varieties, several types differing in colour of the flowers, size, shape and texture of pods, size and colour of the seeds are recognized. The two varieties can be hybridized and several improved varieties have been evolved by the Department of Agriculture, Madras, by crossing *typicus* with lignosus and combining the desirable characters of both the parents.

In the polyploid breeding programme of legumes in this laboratory a project to induce tetraploidy in several varieties of *Dolichos Lablab* was undertaken and the results are presented here.

Materials and methods

Seeds of several varieties of *Dolichos Lablab* were obtained by the courtesy of the Pulse Specialist, Agricultural Research Institute, Coimbatore, and Economic Botanist (Pulses), Agricoltural Research

Institute, Bihar. DL.231 and DL.1458 of the group *lignosus* in havin long and erect inflorescence, and the longer axis of the seeds attache right angles to the sutures, and DL.12 of the group *typicus* in havi short inflorencence axis, and the longer axis of the seeds attache parallel to the sutures, and DL.250, DL.279, DL.453, DL.692, BR.1 BR.19 and BR.20, having mixed characters of both *lignosus* and *typic* groups were taken.

Colchicine Treatment.

The plants were grown in the rabi season in well prepared fiel Pits were dug in lines at a distance of 5 × 5 ft., where cow-dung manur and a little superphosphate were added. Each variety was sown in 5 pits. In each pit 2 healthy seeds were sown after soaking them in water

When the seedlings were 8 to 12 days old, and the first pair c leaves unfolded, the terminal bud in between the first two leaves wa treated with the aquous solution of colchicine. The other seedling, i present, was removed.

The terminal bud was covered with a thin absorbant cotton pad an with a dropper aquous solution of colchicine was added, until the cotto pad was well soaked. Then the seedlings were covered with small ear then pots to check quick evaporation of the aquous solution. At hourl intervals, drops of colchicine solution were added to keep the cotton con tinuously wet during the course of the treatment. The treatments wer started between 7.00 to 7.30 A. M. After the duration of the treatmen the cotton was removed and the apical bud was washed well with wate

The 50 plants of each variety were divided into five groups for th following treatments :

1. Control.
2. 0.25% colchicine for 9 hours.
3. 0.25% colchicine for 3 hours repeated for three successive days
4. 0.5% colchicine for 6 hours.
5. 0.5% colchicine for 9 hours.

Detection of Polyploids.

The tetraploids were mostly identified on the basis of stomatal siz and frequency, as well as pollen size and sterility. Thick, dark gree leaves and larger flowers were additional characters taken into considera tion.

Some of the plants were apparently complete polyploids. They hardly developed any branches and generally were less vigorous. In others, one or more branches had the tetraploid characters (chimeral polyploid).

The following records were taken :

1. Immediate effects of colchicine treatment.
2. Number of suspected polyploids and their nature in different varieties.
3. Breadth and length of the leaf-lets of the mature leaves.
4. Size of stomatal guard cells and number of chloroplasts in each guard cell and number of stomata per unit area (microscopic field at 12.5×40) in the peelings of lower epidemis.
5. Thickness of the leaf and length and breadth of palisade parenchyma cells.
6. Size of the floral parts, pollen size, pollen shape and pollen sterility.
7. Pod size, number of seeds per pod, seed size and weight of 20 seeds.

Cytological Techniques.

Mitotic Preparations : The cut pieces of root tip were washed well in water and treated with the saturated solution of Paradichlorobenzene at a low temperature (10° to 14° C) for 2 to 3 hours washed in water, and transferred to a specimen tube containing 2 percent aceto-orcein and normal hydrochloric acid in the ratio 9 :1. The solution was heated just to the boiling point. Then the solution is cooled and the root tips were squashed in one percent aceto-orcein. Over staining was removed by passing 45% acetic acid under cover glass and pressing it well. The temporary slides were sealed with paraffin.

Meiotic preparations : To study the chromosome behaviour, their association and pairing configuration, a detailed study of the meiosis in the pollen mother cells were carried out.

Flower buds of suitable size were fixed in a solution of acetic acid and alcohol in the ratio 1 : 3 and kept in the solution over night. The best time for fixing was between 10.30 — 11.30 A. M. After washing the buds, they were mordanted in 4% iron alum solution for 1 to 2 hours and then the anthers were dissected out on a dry clean glass slide and smeared in a drop of aceto-carmine solution, covered with a cover glass and pressed evenly when the pollen mother cells were flattened. The slide was slighly heated over a weak flame, 45% acetic acid was run

below the cover slip warmed and pressed to remove the excess of sta from the cytoplasm and to flatten the cells further. The slide w sealed with paraffin.

Observations

Immediate effects of the colchicine treatments.

Following colchicine treatments the growth of the plants w arrested. After about 1-3 weeks they began to recover. The first tw leaves became darker green in colour, coarser and thicker. The breadt of the leaves also increased.

Due to the retarded growth of the terminal bud, invariably branche were produced from the axils of the cotyledons, which were nipped o to remove competition. As apical growth ensued 2-4 shoots were pr duced in many seedlings.

The effects of the colchicine was very conspicuous in the second le where in the place of the normal trifoliate leaves, abnormal leaves wer produced generally with one or two leaf-lets of various abnormal shape Such abnormalities were also seen in the third leaf. These leaf-lets wer comparatively darker green and thicker than the leaves of the contr plants.

Toxic effect of colchicine.

The toxic effect of colchicine and the efficiency of various treatmen in producing at least one polyploid sector in a plant is given in Table

TABLE 1

The effect of various treatments in inducing at least one polyploid sector in all t varieties.

Colchicine concentration	Treatment duration	Number of plants treated	Number of plants survived	Number of polyploids produced	% of polyploids produced
0.25%	9H.1D.	91	91	25	27.4
0.25%	3H.3D.	93	93	31	33.3
0.5 %	6H.1D.	84	84	27	32.1
0.5 %	9H.1D.	85	85	28	32.9
	Total	353	353	111	31.42

Even though the percentage of the polyploids was more or less equal in all the treatments, yet the toxic effect was more pronounced in the 0.25% - 3H.3D. and 0.5% - 9H.1D. treatments. In both of them the plants took a comparatively longer time to recover from the toxic effect. In the case of DL.1458 and DL.231 it took more than one month for the plants to recover and to start a normal growth and development in these treatments.

The effect of colchicine treatments in the different varieties are given in the Table 2.

TABLE 2

The effects of colchicine treatments in producing at least one polyploid sector per plant.

Variety	Number of plants treated	Number of plants survived	Number of polyploids obtained	% of polyploids obtained
DL.12	33	33	8	24.3
DL.231	38	38	7	18.4
DL.250	37	37	17	45.9
DL.279	38	38	5	13.1
DL.453	34	34	16	47.1
DL.692	35	35	22	62.8
DL.1458	31	31	7	22.5
BR.16	39	39	12	30.7
BR.19	29	29	6	20.6
BR.20	39	39	11	28.8
Total:	353	353	111	31.42

The varieties DL.231, DL.279 and DL.1458 were less responsive to the colchicine treatments in the production of polyploid sectors, where as DL.692, DL.250 and DL.453 were more responsive.

Leaves: The petioles of the polyploids were more rough to touch due to the presence of the coarse hairs on them. The internal structure of the petioles revealed that in the tetraploids the mechanical tissue was better developed. For instance the bundle sheaths which was composed of sclerenchyma fibres were longer and broader than those

of the diploids. The hypodermal layer, composed of collenchyma cell was also found to be more thicker in the tetraploids.

To measure the size of the mature leaves two healthy plants from the control and two plants from suspected polyploids were selected. From each plant at least 4 healthy and mature leaves were taken and all the leaf-lets were measured and the average length, breadth and thickness of the leaves are given in Table 3.

TABLE 3

Effects of tetraploidy on the length, breadth, and thickness of leaves.

Variety		Length in cm.	Breadth in cm.	Thickness in μ
DL.12	2n	5.2 ±0.999	5.0 ±0.116	
	4n	5.8 ±0.139	5.75±0.139	
DL.250	2n	6.06±0.127	5.37±0.121	295.16±3.97
	4n	6.38±0.292	6.69±0.292	405.16±3.986
BR.16	2n	4.9 ±0.149	4.2 ±0.124	276.5 ±1.745
	4n	5.2 ±0.178	5.4 ±0.072	395.83±6.063
BR.20	2n	6.4 ±0.117	5.6 ±0.151	398.66±7.116
	4n	6.4 ±0.435	6.3 ±0.399	410.33±3.479

The leaves of the tetraploids were larger than those of the diploids the effect being more conspicuous on the increase in breadth. The thickness of the tetraploid leaves were about one and half times greater than those of the diploids.

The size of the palisade cells, stomatal guard cells, and the stomatal frequency per microscopic field are given in Table 4.

The length and breadth of the palisade parenchyma in tetraploids were greater than those of the diploids, by 1½ and 2 times respectively. Even though both the palisade parenchyma and spongy parenchyma increased in size in tetraploids, the increase in the palisade was comparatively greater.

TABLE 4

Size of palisade cells, stomatal guard cells in microns and stomatal frequency per microscopic field.

Variety		Size of the palisade cells in microns		Size of the stomatal guard cells in microns		Stomatal frequency microscopic field
		Length	Breadth	Length	Breadth	
DL.250	2n	69.83±2.891	10.31±1.014	21.87±1.052	6.3 ±0.185	21.16±-0.401
	4n	125.0 ±8.437	20.45±1.83	34.84±0.296	10.23±0.30	8.67±0,210
BR.16	2n	64.5 ±2.892	10.53±1.167	22.3 ±1.381	6.18±0.172	23.33±0.421
	4n	116.3 ±1.666	21.91±1.74	35.25±0.357	10.37±0.36	9.16±0.307
BR.20	2n	66.63±1.157	10.64±0.211	22.36±1.241	5.91±0.215	25.33±0.333
	4n	120.16±3.210	21.41±1.213	34.58±0.68	10.4 ±0.337	9.66±0.021

As expected, in the tetraploids the guard cells of the stomata were larger in size and the frequency of stomata per unit area was lesser. The average size of the tetraploid guard cells was about $1^1/_2$ times longer as well as broader than those of the diploids. But the frequency of the stomata in the diploids, was about $2^1/_4$ times greater than those of the tetraploids.

Flowers and floral parts.

The tetraploid flowers were conspicuously larger. In some of the suspected polyploid plants, a large number of flower buds did not open at all. The size of the various floral parts of the diploids and tetraploids are given in the Table 5. To measure the various flower parts, the calyx tube was carefully removed and the floral parts were spread on a millimeter graph sheet and slightly pressed to get the accurate measurement. It was observed that each and every part of the suspected polyploid flower were larger.

Pollen size shape and sterility.

The average pollen size and sterility percentage in the diploids and tetraploids are given in Table 6.

TABLE 5

The size of the various floral parts in the diploid and tetraploid varieties in cms

Variety		Calyx Tube Leng.	Bread.	Standard Leng.	Bread.	Ovary Leng.	Style Leng.
DL.12	2n	1.15	0.82	1.16	2.01	0.78	0.80
	4n	1.32	0.98	1.36	2.38	1.22	1.11
Difference		0.17	0.16	0.20	0.37	0.44	0.31
DL.250	2n	1.26	0.82	1.18	2.06	0.75	0.87
	4n	1.60	1.10	1.45	2.34	1.11	1.12
Difference		0.34	0.28	0.27	0.28	0.36	0.25
BR.16	2n	1.20	0.84	1.20	2.04	0.74	0.66
	4n	1.68	1.24	1.36	2.40	1.12	1.10
Difference		0.48	0.40	0.16	0.36	0.38	0.44
BR.20	2n	1.28	0.78	1.14	2.06	0.74	0.86
	4n	1.66	1.14	1.45	2.35	1.11	1.10
Difference		0.38	0.36	0.31	0.29	0.37	0.24

Table 6

Pollen sterility and pollen size in the diploids and tetraploids.

Variety	Pollen sterility %		Pollen size in microns			
	2n	4n	2n Length	2n Breadth	4n Length	4n Breadth
DL.12	9	28	46.3 ±0.144	45.0 ±0.321	61.3 ±0.70	58.9 ±0.498
DL.250	7	27	47.67±0.455	46.1 ±0.402	62.76±1.228	60.06±0.994
BR.16	6	26	46.50±0.132	45.2 ±0.306	63.10±0.876	60.9 ±0.848
BR.20	6	25	45.9 ±0.166	44.9 ±0.20	63.6 ±0.554	61.0 ±0.381

In the diploid the pollens were circular or slightly oval and more or less uniform. But in the tetraploids in addition to the circular and oval types, squarish shapes, were also common. Though normally the tetraploid pollen grains were 40% to 45% larger than those of the diploids, but some of the tetraploid pollen were much larger. But the percentage of those pollens were less than 0.1%.

Pods and seeds.

The number of pods produced in the polyploid sectors were comparatively less in number than the diploid ones. They were of variable sizes with many aborted seeds. From the nature of these seeds it seems that most of the ovules started to grow but collapsed at different stages of development. The average length and breadth of the six largest pods and number of seeds per pod are given in the Table 7.

TABLE 7

Length and breadth of the pods and number of seeds per pod, size and weight of seeds, in the diploids and their tetraploids.

Variety		Pod size in cms.		Number of seeds per pod	Seed size in cms.		Wt. of 20 seeds in grams
		Length	Breadth		Length	Breadth	
DL.12	2n	11.8 ±0.404	1.07±0.029	5.1 ±0.100	1.28 ±0.019	0.93 ±0.016	8.80
	4n	12.03±0.267	1.17±0.133	3.6 ±0.353	1.33 ±0.022	1.105±0.007	9.28
DL.250	2n	6.4 ±0.245	2.4 ±0.417	3.0 ±0.239	1.292±0.043	0.917±0.021	10.00
	4n	6.3 ±0.595	2.8 ±0.089	2.6 ±0.407	1.44 ±0.014	1.01 ±0.018	11.25
BR.16	2n	6.24±0.171	2.6 ±0.062	2.3 ±0.282	1.195±0.031	0.929±0.029	8.5
	4n	5.92±0.225	2.35±0.093	3.8 ±0.209	1.25 ±0.014	0.93 ±0.018	9.0
BR.20	2n	7.98±0.250	2.17±0.062	4.2 ±0.204	1.15 ±0.021	0.779±0.014	6.0
	4n	7.59±0.262	2.2 ±0.056	3.45±0.293	1.257±0.023	0.873±0.021	8.0

Among the large pods produced in the diploids and tetraploids the length of the pod increased in DL.12, where the longer axis of the seeds

is parallel to the suture. The only appreciable increase in breadth of the pods was in DL.250.

Even in these selected pods the number of seeds per pod were reduced. The reduction of seed number was variable but was more in the varieties with 4-5 seeds per pod than in the varieties with less than 4 seeds per pod.

The seed size and seed weight, however, invariably increased in all the varieties. In BR.20 the seeds were smallest and the percentage of increase was maximum at the tetraploid level.

Meiotic studies.

Diploids: Meiosis in 3 varieties was found to be normal and regular. Eleven bivalents were noticed both at diakinesis and metaphase I. Only one pair of chromosomes was found to be attached to the nucleolus and only one nucleolus was observed. Regular separation was noticed at the anaphase I. At telophase I at each pole only one nucleolus was found to be common and in some plates two nucleoli were observed in each pole. The second division was also found to be regular. The pollen fertility was about 94% except in the varieties BR.19 and DL.12 where it was about 90%.

Tetraploids: At diakinesis and at metaphase I it was found that the chromosome number was 44 in each cell. But varying number of quadrivalents, trivalents, bivalents and univalents were noticed in different cells. The frequencies of chromosome configurations observed in three varieties are given in Table 8.

TABLE 8

Chromosome configurations at diakinesis and metaphase I in 3 varieties of induced tetraploids.

Variety	Number of cells studied	Total number of configuration				Frequency per cells			
		Quadrivalent	Trivalent	Bivalent	Univalent	Quadrivalent	Trivalent	Bivalent	Univalent
DL.250	20	130	13	156	24	6.5	0.65	7.8	1.2
DL.453	20	152	12	108	20	7.6	0.6	5.4	1.0
DL.692	20	133	11	152	21	6.6	0.5	7.6	1.0

The frequency of quadrivalents and bivalents were fairly high in l the three varieties. In DL.453 more quadrivalents than bivalents ere observed but in DL.250 and in DL.692 the number of bivalents as more. The frequency of trivalents and univalents were fairly low hich indicated that the chromosomes tend to remain paired in most of ie cells. In the variety DL.453 as many as 10 quadrivalents per cell as observed in some cells. The minimum number of quadrivalents ere observed in the variety DL.250, being only 2 in cell.

In anaphase I, precocious movements of some chromosomes were ommon feature. But cells with precocious movements were minimum the variety DL.453. In one slide out of the 20 cells observed only in cells with precocious movement was noticed. But it was a common henomenon in the variety DL.692 where in almost all the cells it as noticed. In the same manner the number of precociously moving hromosomes also varied.

Subsequent meiotic disturbance was not pronounced. In several lates regular distribution of chromosomes to the poles were seen. In he variety DL.692, two to four lagging chromosomes were noticed in everal cells. The second division in all the varieties was also fairly egular.

In several tetrads microspores were seen. Their number varied rom 1 to 3 being of variable sizes.

Mitotic studies.

Dolichos Lablab: is not a favourable material for detailed studies of he chromosome morphology. But by using suitable techniques quite ood mitotic plates were obtained. The mitotic studies in the growing oot tips of 3 diploid varieties were carried out and it was found that he somatic cells contained 11 pairs of chromosomes. Most of the chro- nosomes have median or submedian centromere. One pair of chromos- mes with satellite was found (fig. 1), but there may be a second pair. In the root tip cells of the tetraploid seeds 44 chromosomes were seen.

Discussion

The treatment of apical bud with aquous solution of colchicine in a cotton plug was found to be quite satisfactory to induce tetraploidy in the varieties of *Dolichos Lablab*. All the treatments gave more or less

the same number of plants with polyploid sectors taking all the variet collectively, even though the concentration of colchicine solution a duration of treatments were varied considerably. Response of the va ties to produce tetraploid sectors, however, varied. The variet DL.692, DL.250 and DL.1453 produced more polyploids, where as varieties DL.279 and BR.19 gave comparatively few.

All treatments, however, gave at least one plant with polypl sector. It seems that within the concentration and the duration u any one of them may be used to induce polyploidy in *Dolichos Lab* varieties. VIDYABHUSHAN (unpublished) obtained more or less simi results in horse gram (*Dolichos biflorus*). But GHOSH (unpublish working with green gram (*Phaseolus aureus*) and CHEEDA (1957) work with black gram (*Phaseolus Mungo*) found certain concentrations m suitable than the others in polyploid production. The results of the ot workers on inducing tetraploidy in legumes with colchicine show t wide range of colchicine concentration and exposure period has b successfully used. EIGSTI and DUSTIN's (1955) general conclusion that about 0.2% colchicine concentration is quite suitable to ind tetraploidy in most of the plant materials is supported by this ex riment. It also appears that the technique of treating the apical b is a suitable one to induce tetraploidy in most of the legumes. An sublethal dose by varying exposure period with 0.2% to 0.25% colchic is likely to succeed in most cases.

It has now been fairly well established that polyploidy increa cell sizes in the meristematics tissues. There are also enough eviden to conclude that the increased cell size is due to the increased nucl size which in turn is due to increased chromosomal material. Thou the ultimate size of the cells depends on the amount of cell elongati cells like stomatal guard cells and pollen grains have been found to invariably increased and this is taken as a fairly good index for identification of the polyploids. The longer diameter of the pol grains in the different varieties of diploids varied between 45.9 48.1 μ and the shorter diameter from 44.8 to 46.5 μ. The longer diame of the tetraploid pollen grains varied between 58.9 to 63.6 μ and shorter one from 56.3 to 62.3 μ i. e. about 40-45% larger than the dipl ones. The increase due to tetraploidy varied in different varieties the varieties with largest or smallest diploid pollen did not give largest and smallest pollen at tetraploid level. The variability of

etraploid pollen was much more than in the diploids as seen from heir much larger standard error in general.

Similarly the length and breadth of the stomatal guard cells in the hree varieties studied varied between 21.87 to 22.36 μ and breadth etween 5.6 to 6.3 μ; while at the tetraploid level the length varied etween 34.5 to 35.2 μ and breadth from 10.2 to 10.4 μ i. e. increase of bout 50 per cent. The sizes of other epidermal cells have also similarly ncreased resulting in decrease of stomatal frequency per microscopic eld to about 40% of the diploid level.

The third type of cells measured were those of the palisade parenhyma, where in the diploid, length varied between 64.5 to 69.8 μ and readth from 10.31 to 10.64 μ; while at the tetraploid level the length aried from 116.0 to 125.0 μ and breadth from 20.45 to 21.41 μ i. e. the ncrease was about 80% in length and 100% in breadth.

The effects of tetraploidy on these three types of cells clearly show hat cell sizes considerably increased but the proportion of increase is nfluenced by the type of cell and also by the genotype of the variety.

Giganticism in many characters are common features and is generlly associated with the primary effect of tetraploidy in increasing cell ize or volume. The appreciable increase in size, total number of cells emaining more or less the same as the diploid form will make the etraploid plant and its organs appear larger than the diploid individuals. But giganticism may not be expressed in all parts as the increase n cell volume may be followed by a decrease in the total number of ells making up the plant or the organ, and then the tetraploid will not ppear different from the diploid and may be of reduced size. In eneral, the gigas effects of tetraploidy are expressed best in organs vith a determinate type of growth such as sepals, petals, seeds etc.

The giganticism of all the floral parts due to tetraploidy was so uarked that the flower size was found to be a good index to spot etraploid plants and branches. Increase due to tetraploidy to different xtent has been observed in all the floral parts, calyx tube, standard, ving, keel, staminal sheath and carpel. Considerable varietal difference n increase in different parts was observed.

The thick fleshy dark green leaves is another conspicuous feature f the tetraploids and have been successfully used as a criterion for letecting induced colchiploids in the treatment generation of green gram, black gram, cowpea and soybean in this laboratory. The thickness of mature leaves in the suspected tetraploid sectors was about 25-

30% more and the fleshy look was very conspicuous. The increas length of the palisade parenchyma contributed more to the increase thickness than the spongy layer.

As in the other legumes studied in this laboratory breadth of leaves invariably increased. The length, however, either did not incre except in a couple of varieties but reduction as in the green gram v not observed. The leaves were darker green in colour. The chloropla appeared to be more per cell, larger and darker green in colour in palisade cells of the tetraploids. Mechanical tissues were also m developed in the petioles of the tetraploid leaves, the sclerenchymat fibres being longer and broader than those in the diploids.

The plants were grown a little late in the season and the tetrapl sectors were nourished with a diploid root system and in most cases partly diploid shoots. Comparative study of physiological charact like growth, vigour, yield etc. of the tetraploids, has been postpo till the tetraploid progenies of these plants are raised. But the comm general characteristics of the autotetraploids like slow but prolong growth, higher water content etc. were apparent in the tetrapl branches on the diploid plants. The flowering and the peak flower times were also slightly delayed and the pod setting per flower co derably reduced. The slower rate of growth in tetraploids has genera been attributed to reduced rate of cell division smaller amount of gro hormone present and slower rate of metabolic activities.

Low fertility of autotetraploids has been attributed to cytologi abnormalities such as misdisjunction of multivalents; unpaired ch mosomes at anaphase, lagging chromosomes at anaphase I and II e Probabilities of gene-conditioned reduced fertility have been sugges by RANDOLPH (1941). STEBBINS (1950) is of opinion that sterility is mai due to genetically controlled factors of an unknown nature. KUCKU and LEVAN (1951) attribute it to the upset of delicately balanced syst of genic interaction consequent upon chromosome doubling. PARTH SARATHY and RANJAN (1953) suggest that like many other econo characters fertility is also governed by a system of polygenes or modi genes, which is in a balanced state in the diploid, which can be resto at the tetraploid level by the adoption of suitable breeding procedu

Compared to the autotetraploids in general, the fertility of the r colchiploids of *Dolichos Lablab* is not bad. Only 20-30% of the pol are shrunken and empty. Of course, in the variable pollens of the tet ploids many are likely to be sterile but still considering the few pol

necessary to produce 3-5 seeds in the pods of different varieties, this factor is not unlikely to be an important one for reducing fertility. As in general sterility of the eggs are less than in those of the pollen, it seems that haplontic sterility is at least not a major factor for the reduced fertility in the autotetraploids of *Dolichos Lablab*. Similar results have been observed by VIDYABHUSAN (unpublished) with *Dolichos biflorus*. Post fertilization abnormalities causing seed abortion has been reported in several plants, but nothing more about it can be said before proper embryological study.

The number of seeds per pod in these colchiploids is quite satisfactory for an autotetraploid. How far the diploid sectors are contributing to such fertility can only be said after growing the next generation. In two years of selection, VIDYABHUSAN (unpublished) has been able to select lines in *Dolichos biflorus* where several plants have approached the diploids grown side by side as control and having in addition higher protein content of the seeds and green matter. If *Dolichos Lablab* responds in the same way it would be interesting to study the behaviour of the other *Dolichos* species to tetraploidy.

The seeds being of one of the other organ with determinative type of growth, generally expresses giganiticism at the tetraploid level. Increase in seed size to different extent is seen in all the varieties. This may be one of the causes of lesser seeds per fruit and compensates partly for the loss in seed number. The increased seed size is associated with increased pod size. The varieties where the longer axis of the seeds are parallel to the sutures, the length of the pod increased; and in the varieties where it is at right angles to the suture the breadth of the pod increased.

The chromosome number of *Dolichos Lablab* was reported by KARPECHENKO (1925) and KAWAKAMI (1930) as $2n = 22$; but by RAU (1929) as $2n = 24$. Later AYYANGER and KRISHNASWAMY (1935) after studying several garden and field varieties confirmed 24 as its diploid number. However, recently FRAHM-LELIVELD (1953) and ROY and SARAN (1959) have again reported $2n = 22$ for the species.

The mitotic chromosomes in the complement of the several varieties of *Dolichos Lablab* studied were small, like those of *Phaseolus* and *Vigna*. Good plates could only be obtained after chemical pretreatment. The number of chromosomes were $2n = 22$ the chromosomes having median and submedian primary constrictions. One satellited chromosome pair could be clearly distinguished, and the longest pair appeared to

have secondary constriction in the long arm in many plates. The doubling of chromosome number was seen in the root tips of the tetraploid seeds. The cells and nuclei appeared larger but as they were studied in root tip squashes and thus susceptable to deformity during pressing, comparative measurements were not taken.

The meiotic preparations on the other hand was comparatively easier. A couple of anthers often gave hundreds of pollen mother cells, the cells could be flattened well and the chromosomes though small took good stain. Due to the small size of the meiotic chromosomes even at early diakinesis, it has not been possible to study chiasma frequency in the diploids. One bivalent was always found to be associated with the nucleolus which was comparatively small considering the size of the pollen mother cells. Eleven bivalents were present in diakinesis and metaphase I and the chromosome number could be confirmed from anaphases I and II.

Forty four chromosomes were present in the flowers of the tetraploid sectors. At diakinesis they mostly formed quadrivalents and bivalents more or less in equal number. Theoretically in an autotetraploid of a basic species all the four homologus chromosomes should pair in early prophase. But whether all the four will remain together as quadrivalents during the phase of contraction and separation is mostly determined by the number of chiasma. Though it has not been possible to study the chiasma frequency in detail, in most of the diakinesis plates it was seen that about half of the chromosomes have chiasma in both the arms and the other half appeared to have chiasma in one of the arms only with variation of one or two in their numbers either way. With such small bivalents there are, however, chances of misscoring. It is presumed that the bivalents with chiasma in both the arms at tetraploid level gave rise to quadrivalents and the ones with the one chiasma gave rise to bivalents. The 1-2 univalents per cell is likely to be due to failure of chiasma formation in the quadrivalents of the complement, the chromosomes being free moved out precociously. In the tetraploids of the allied genera *Vigna* and *Phaseolus,* only few quadrivalent and many bivalents were found in *Vigna sinensis* varieties by BHOWAL (1958); in *Phaseolus mungo* varieties by CHEEDA (1957). But VIDYABHUSAN (unpublished) found in the tetraploids of *Dolichos biflorus* (diploids 2n = 20; tetraploid 2n = 40) about equal number of quadrivalents and bivalents about 6 of each per cell with one to two univalents and fewer trivalents. Except for the indentifying character the lateral and terminal stigma

olichos Lablab have more common morphological characters with *Vi-a sinensis* than with *Dolichos biflorus*. In quadrivalent formation of eir autotetraploids, however, *Dolichos Lablab* have greater affinity with *olichos biflorus*.

The usual meiotic irregularities due to quadrivalent, trivalent and ivalent formations were seen. In general, however, the irregularity ere not very much pronounced.

In conclusion it may be said that the comparatively high fertility the colchiploids of *Dolichos Lablab* is an encouraging feature to olve suitable tetraploid varieties. Its fleshy leaves and longer growth riod should make it a suitable material as a fodder legume, and if the otein content is higher that will be an additional advantage. The gger pods and seeds are two desirable qualities for their use as vege-ble and pulse. But how far they will be better or even equal to the ploids can only be said after growing pure tetraploid generations and nproving further by selection and recombination breeding at the tetra-loid level.

REFERENCES

YYANGAR G. N. R. and KRISHNASWAMY N., 1935. — *Chromosome Number in Dolichos Lablab L.* Curr. Sci., **4**: 739.

HOWAL J. G., 1958. — *Studies on cytotaxonomy genetics and induced tetraploidy in Vigna.* Thesis submitted for Ph. D. Degree, I. I. T.

HEDDA H. R., 1957. — *Genetics and breedings of black gram.* Thesis submitted for M. Tech. degree of I. I. T.

IGSTI O. J. and DUSTIN P., 1955. — *Colchicine in Agriculture, Medicine, Biology and Chemistry.* Iowa State College Press, Ames, Iowa.

RAHM-LELIVELD J. A., 1953. — Euphytica, **2**: 46.

ARPECHENKO G. D., 1925. — Bull. Appl. Bot. Pl.-Breed., **14**: 143.

AWAKAMI J., 1930. — Bot. Mag. Tokyo, **44**: 319-343.

UCKUCK H. and LEVAN A., 1951. — *Vergleichande untersuchungen an diploiden and tetraploiden Leinsippen und an tetraploiden Kreuzungs nach kommenschaften nach viel jahriger selection.* Zuchter, **21**: 195-205.

ARTHASARATHY N. and RAJAN S. S., 1953. — *Studies in the fertility of autotetraploid Brassica campestris var. toria.* Euphytica, **2**: 25-36.

AU N. S., 1929. — *Further contributions to the cytology of some crop plants of south India.* J. Ind. Bot. Soc., **8**: 201-206.

RANDOLPH L. F., 1941. — *An evaluation of induced polyploidy as a method of breed crop plants.* Amer. Nat., **75**: 347-355.

ROY R. P. and SARAN J., 1959. — *Cytogenetical investigation in beans, Dolichos Lablab* Proc. Ind. Sci. Congress, **46**: 305.

STEBBINS G. L., 1950. — *Variation and evolution in plants.* Oxford University Pr London.

EXPLANATION OF PLATE LIV

Colchiploids of Dolichos Lablab L. — Fig. 1. Somatic chromosome complement diploid. — Fig. 2. Somatic chromosome complement of an induced tetraploid. — Fig and 4. Diakinensis and metaphase configurations in the colchiploid.

SUMMARY

1. The apical buds of young seedlings of 10 varieties of *Dolichos Lablab* w treated with 0.25% and 0.5% aquous colchicine solution for 6, and 9 hours, and 3 ho each day for 3 days. All the treatments proved more or less equally effective in production of polyploid sectors in the number of plants treated.

2. The varieties differed in their response to production of polyploids in the differ treatments. It has been concluded that treating the apical bud of seedling with of these doses is quite suitable for colchiploid production in *Dolichos lablab.*

3. The polyploids were either apparently complete polyploids or branch polyplo

4. The colchiploid sectors were vigorous in growth with broader, thicker and d green leaves, with larger and well developed palisade tissue and larger stomata.

5. The tetraploid flowers, flower parts and pollen were bigger than those of diploids.

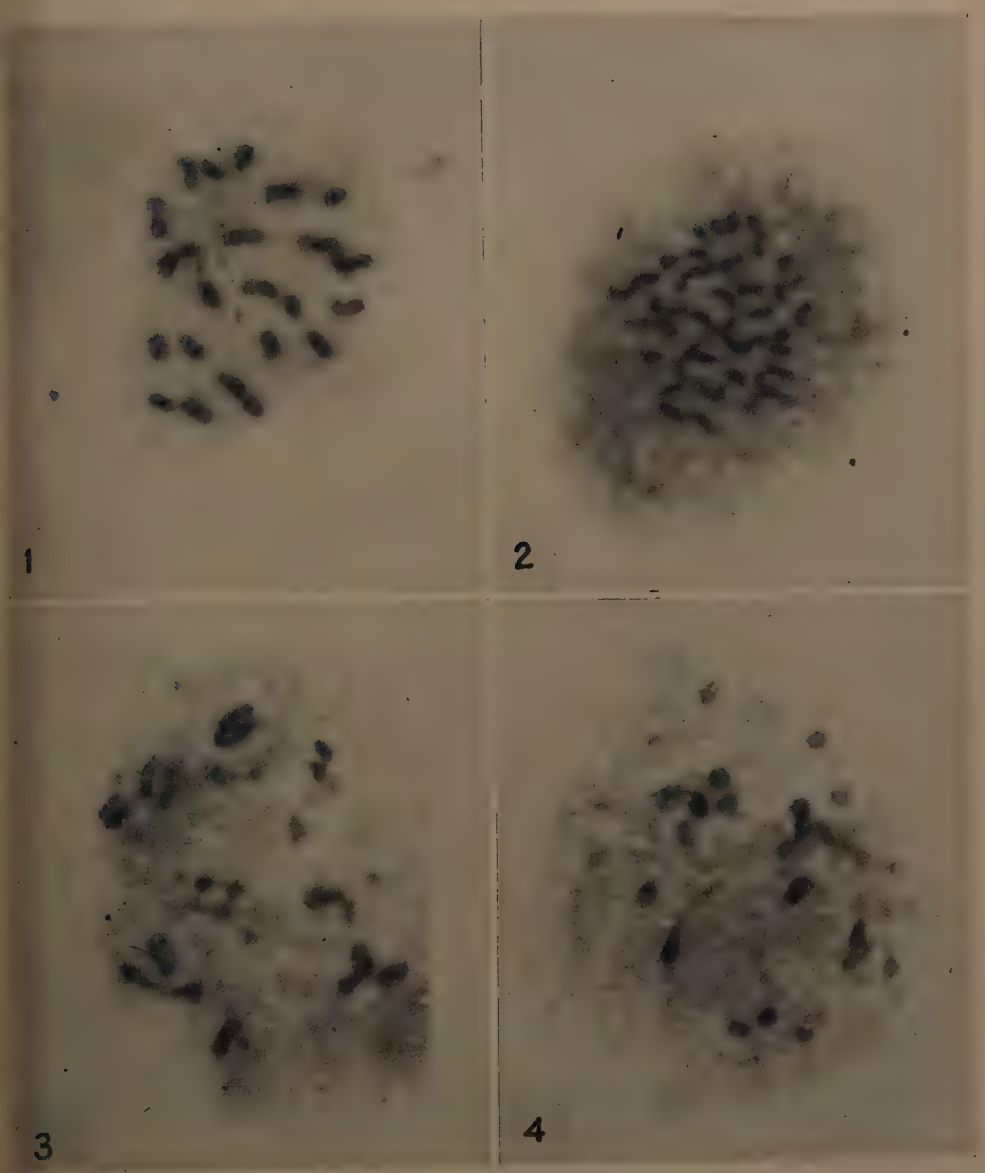
6. The pollen fertility of tetraploids ranged between 70% to 75%, where as diploid it was between 90% to 95%.

7. Pod setting in tetraploids were good. Though there were not much differenc the lengths of the large diploid and tetraploid pods, in most of the cases the breadth the tetraploid pods were more than those of the diploids.

8. The tetraploid seeds were fewer per pod but bigger in size.

9. Considerable varietal difference in the tetraploids were noticed in the size of leaf, flower size, pollen size, pollen sterility, fruit setting, seeds per pod, size weight of seeds.

10. The number of chromosomes were found to be $n = 11$ and $2n = 22$ in diploids and $n = 22$ and $2n = 44$ in the tetraploids. The mitotic chromosomes w small with median, and sub median primary constriction with one pair of satelli chromosome.



N. K. SEN and K. M. MARIMUTHU — Colchiploids of *Dolichos Lablab* L.

11. In the diakinesis and metaphase I of the tetraploids most of the chromosomes were seen paired as quadrivalents and bivalents, more or less in equal frequency. Subsequent meiotic irregularities due to quadrivalents, trivalents and univalents were variable but not very pronounced.

RIASSUNTO

Le gemme apicali di giovani piantule di 10 varietà di *Dolichos Lablab* L. (Leguminosae) sono state trattate con soluzioni in acqua di colchicina a 0,25% e a 0,5% per 6, per 9, e per 3 ore ciascun giorno per 3 giorni. Tutti i trattamenti si sono dimostrati più o meno egualmente efficenti nella produzione di settori poliploidi nelle piante trattate.

Vi sono differenze fra le varietà nella loro risposta per la produzione di poliploidi a seguito dei differenti trattamenti. Se ne conclude che per la produzione di poliploidi da colchicina in *Dolichos Lablab* è quasi sempre conveniente un trattamento della gemma apicale delle plantule con una delle suddette dosi.

Le piante poliploidi si presentano sia come poliploidi apparentemente completi sia con solo alcuni rami poliploidi.

I settori poliploidizzati con colchicina sono più vigorosi nella crescita, con foglie più larghe, più spesse e verdi più scure, fornite di tessuto a palizzata più grande e ben sviluppato e di stomi più grandi.

Nei tetraploidi i fiori, le parti fiorali e il polline sono più grandi di quelli dei diploidi.

La fertilità pollinica dei tetraploidi si aggira fra il 70% e il 75%, mentre nel diploide si aggira fra il 90% e il 95%.

La produzione di legumi nei tetraploidi è buona. Benchè non ci sia sensibile differenza nella lunghezza fra i legumi diploidi larghi e di quelli tetraploidi, in molti casi la larghezza dei legumi tetraploidi è maggiore di quella dei diploidi.

I semi dei tetraploidi sono meno numerosi per legume, ma più grossi.

Si verificano considerevoli differenze varietali nei tetraploidi per la grandezza delle foglie, dei fiori e del polline, per la sterilità del polline, per la produzione dei frutti, del numero dei semi per legume e per la grossezza e il peso dei semi.

Il numero dei cromosomi è $n = 11$ e $2n = 22$ per i diploidi, e $n = 22$ e $2n = 44$ nei tetraploidi. I cromosomi mitotici sono piccoli con costrizioni primarie mediane e submediane, con un paio di cromosomi satelliferi.

Nella diacinesi e nella metafase della prima divisione meiotica dei tetraploidi la maggior parte dei cromosomi furono visti appaiati come quadrivalenti e bivalenti più o meno con la stessa frequenza.

Le susseguenti irregolarità meiotiche dovute ai quadrivalenti, trivalenti e univalenti sono variabili, ma non molto pronunciate.

ENRICO MESSERI

RICERCA SPERIMENTALE SUL COMPORTAMENTO FENOTIPICO DEGLI EPILETTICI VERSO IL TEST *PTC*

(con 1 figura nel testo) *

In redazione: il 10 Giugno 1959

Introduzione

Accade spesso che i medici trattino delle malattie ereditarie con pareri assai discordi, il che deriva evidentemente da scarsa conoscenza sull'argomento. In un recentissimo congresso abbiamo sentito parlare della *epilessia*, come di una malattia di scarso interesse eugenico, e tale da non controindicare nè la discendenza, nè le attività più precise dell'uomo (uso di macchine industriali e guida di autoveicoli!).

Malgrado questi paradossi, la scienza genetica cerca ogni giorno di approfondire sempre più la conoscenza sulla patogenesi dell'affezione, ancora avvolta nell'ombra. Con l'espressione generica di « *epilessia* » noi infatti delimitiamo appena una « sindrome » e non certo un quadro nosologico differenziato. Esiste come è noto l'epilessia « secondaria » ad una lesione isolata o diffusa dell'encefalo, e l'epilessia « primitiva » o essenziale, verosimilmente sostenuta da una neuro-malformazione citoarchitectonica embrionaria, che in genere si manifesta clinicamente, dalla pubertà alla maturità e oltre, pur esistendo anche nella infanzia, con fisionomia clinica particolare (Pachioli, Cheli, ecc.). Purtroppo si tratta di una affezione non rara, se si pensa che le statistiche recenti, molto approssimative semmai per difetto, danno le percentuali dell'1 su mille in Francia (Jolly) e dal 3 al 5 per mille in Germania (Conrad), con una certa predominanza nel sesso maschile. In un recente studio sull'argomento sembra che in America, Svizzera e Olanda, il tasso della malattia arrivi allo 0,5% della popolazione, vale a dire un epilettico ogni 200 sani; da ciò si dedurrebbe che nel mondo attualmente esistono tredici milioni e mezzo di epilettici. Queste cifre fanno comprendere la enorme importanza che la malattia assume nell'ambito sociale e in tutte

* Lavoro eseguito presso l'Istituto di Fisiologia generale dell'Università di Messina.

le età della vita, ma sopratutto all'atto del matrimonio, per la sua proiezione genetica nel futuro, temendosi più le forme equivalenti che quelle genuine convulsive, come accenneremo più oltre.

L'epilessia essenziale molto verosimilmente è ereditaria malgrado le discussioni ancora accese sull'argomento: DUBLINEAU, RICHARD, BOSCHI, BUVART, ecc.(1) sostengono l'eredità, mentre la negano LHERMITTE, HARTEMBERG, LECONT, ecc.). Secondo FISHBERG la malattia sarebbe assai frequente nella razza ebraica (3‰). La costituzione organica denota una influenza assai netta sulla frequenza morbosa: su 1373 casi di epilessia genuina il massimo di frequenza è stato notato nei soggetti displasici (37,6%), negli atletici (33,1%), meno nei leptosomi (15%) e atleto-leptosomi (10%) e minimo nei picnici (4%) ecc. (HOFFMANN, GUMDLER, DELBRUK, GRAF, RODEN, KREYEMBERG, ecc.). Secondo KRETSCHMER esisterebbe una vera e propria «costituzione epilettoide» caratterizzata sul piano psichico dalla tendenza alla perseveranza, dalla viscosità del temperamento e della condotta, con repentine esplosioni di intolleranza. Questo carattere sarebbe collegato con la costituzione displasica nel 30% dei casi, con quella atletica nel 29%, con quella leptosomica nel 25%, e scarsamente con quella picnica (5%), ecc. I casi familiari della epilessia genuina pure sarebbero abbastanza frequenti, secondo LENNOX nel 3,2%, secondo HEUYER nel 7,4%, GEETS 8,5%, LEURET 10% e MOREAU 13%. Nei progenitori di epilettici la malattia si trova nel 3% dei casi secondo HEUYER, nel 4% secondo KEMP e perfino nel 12% secondo KÜFFNER; e nei discendenti di epilettici dal 3 al 6% (PAILLAS) all'8,7% (CONRAD). Nell'insieme dei collaterali la malattia si aggirerebbe sul 4,5% dei casi (HEUYER e VOGT). In singole constatazioni familiari sono stati osservati, insieme affetti, madre e tre figli (GOLDSTEIN), oppure padre psicopatico e 4 figli epilettici su 6 (MICHAUX), e persino 13 membri su 20 in 4 generazioni (GALLOT e BUVAT).

Molte di queste discordanze sulle frequenze assolute e relative della malattia sono dovute alle interpretazioni cliniche della affezione. A questo proposito, molto acutamente osserva il TOURAINE (1955) che la epilessia deve essere considerata come un elemento dello stato polifenico sindromico, che può manifestarsi clinicamente sotto le forme più svariate degli equivalenti epilettici: vertigini, assenze, piccolo male e stato crepuscolare nel 10% dei casi, secondo MUSKENS, minorazione mentale circa nel 20% dei casi, secondo BOENING, narcolessia (WILSON, GRÜN,

(1) Tutti gli Autori citati nel testo senza la data sono stati reperiti in TOURAINE 1955.

ecc.), allucinazioni, mutismo, amnesia, mioclonia (JONESCO), enuresi notturna, spasmofilia (KLOTZ), ed infine emicrania con turbe elettroencefalografiche nel 60% dei casi (PAILLAS). Se consideriamo pertanto questi equivalenti morbosi dell'affezione epilettica, le dimensioni della frequenza familiare divengono molto più ampie e oscillano dal 24% secondo HEUYER e VOGT, al 33% secondo MUSKENS, 50% (MOREAU), 70% (CONRAD) e fino all'80% secondo le statistiche recenti di FUCHS. Cifre veramente impressionanti da un punto di vista eugenico! Ed anche genodinamico, in quanto esiste molto probabilmente un fattore letale (BREYNAERT) che agisce talvolta in omozigosi, con morte entro il primo decennio di vita nel 40% dei casi ritenuti tali, nei collaterali (LUXEMBURGER).

La modalità di trasmissione dell'affezione non è ancora ben conosciuta, si avrebbe la dominanza semplice e irregolare, e talvolta la recessività secondo CONRAD. È difficile poter dire se si tratta in questo caso di polimeria o di pluralità di genotipi. Gli studi sui gemelli veri (MZ) hanno messo in evidenza una concordanza nel 56% dei casi (CONRAD) contro il 10,4% nei gemelli DZ. Secondo LENNOX si avrebbe la concordanza nei MZ nel 17% (con lesioni cerebrali) e fino all'84% (senza lesioni cerebrali), contro l'8% appena nei DZ. Secondo le recenti ricerche di GEETS 21 su 29 MZ hanno rivelato perfetta concordanza.

L'epilessia essenziale in conclusione appare come una grave affezione polimorfa del sistema nervoso centrale, correlata variamente con altre sindromi neuropsichiche (*Parkinson, Schizofrenia, Idiozia, ecc.*), e pertanto l'eredità della sindrome epilettica non deve essere considerata come a se stante e ristretta alla ripetizione del suo quadro clinico classico nei discendenti, ma concepita come un segno di associazioni varie con altre sindromi neuropsichiche talvolta più debilitanti della malattia convulsivante.

Anche la fisiopatologia sperimentale si è occupata a lungo della sindrome epilettica, e a questo proposito la nostra Scuola ha dato dei notevoli contributi alla chiarificazione di alcuni aspetti della complessa ed oscura patogenesi (AMANTEA, MARTINO, ALIBRANDI: da MARTINO 1958). È stata notata nel cane una speciale predisposizione alla «epilessia riflessa» di AMANTEA nel 25% degli animali (MARTINO), percentuale che varia con la dieta impiegata nell'alimentazione sperimentale degli animali (ALIBRANDI).

La reattività epilettogena dipenderebbe da una più o meno intensa tendenza alla sommazione centrale degli impulsi, sostenuta da una deficienza di sistemi enzimatici capaci di salvaguardare i centri nervosi dall'accavallarsi degli impulsi afferenti (ALIBRANDI). Questo meccanismo

azione è stato invocato anche di recente a proposito delle superiori ività nervose nel suicidio (MESSERI 1957). La percentuale degli ani- li costituzionalmente predisposti fa sospettare che alla base di questi scono delle forze genodinamiche che caratterizzano latentamente la tesi epilettogena. Niente di più probabile che alla base della patoge- si umana in questo vasto campo di disfunzioni corticali dell'encefalo, alogamente a quanto sperimentato dalla nostra Scuola, esistono dispo- ioni diatesiche ereditarie che favoriscono la violenta e generalizzata ività corticale che è responsabile dell'accesso epilettico o dei suoi oteiformi equivalenti. Come si vede pertanto da un problema eminen- nente neurofisiologico si scende ad un concetto eredo-diatesico; su esta impostazione biologica si inquadra più agevolmente la polimorfa ntomologia della sindrome e si arriva a considerare obiettivamente diverse esplicazioni fenotipiche dell'affezione. Non è da escludere che la base della diatesi epilettogena umana agiscano dei geni capaci di occare la catena reazionale enzimatica sopraccennata.

Secondo CURTIUS e WILSON nell'80% dei casi di epilessia traumatica nota una tara neuropatica preesistente, il che denunzia la presenza un substrato endogeno diatesico. Mentre nella popolazione normale pilessia sarebbe rappresentata nello 0,3%, nei fratelli di epilettici vece nel 3%, nei figli nel 10%, considerando poi anche le forme equi- lenti, l'eredità si dilata sino al 20% nei fratelli e il 16% nei nipoti, BOENIG). Sui gemelli MZ il CONRAD avrebbe trovato concordanza nel 66% i casi e solo nel 3% nei DZ, e se si considera la forma essenziale sol- nto la concordanza aumenta nei MZ fino all'86% mentre nei DZ solo l 4%. È stato notato anche che talvolta nei MZ la concordanza è asso- ta; secondo MAUZ questi gemelli avrebbero un carico di eredità diffusa n precoce inizio (prepuberale) della sintomatologia ed aggravamento rogressivo (demenza); in casi di MZ con concordanza relativa invece forma appare più tardiva (postpuberale) e ad andamento più lento leggero. La spiegazione di ciò secondo CONRAD starebbe nell'alto grado variabilità espressiva del gene, o geni responsabili, e ciò sarebbe nfermato anche dalle ricerche elettroencefalografiche di LENNOX e di IBBS che misero in evidenza curve disritmiche nei tracciati encefalo- afici di parenti di epilettici apparentemente sani (probabili eterorigo-), ciò che non fu riscontrato invece nella parentela di persone del tutto rmali. Come afferma STRAUDER l'eredità della sindrome è ormai fuori ubbio, mentre rimane oscuro ancora il meccanismo di trasmissione. econdo il LUXEMBURGER si tratterebbe in molti casi di recessività, come ferma anche il CURTIUS (recessività complessa). LENZ insiste sul fatto

che la maggiore frequenza fra i figli (10%) che fra i fratelli (5%) di epilettici denota contro la recessività. Il GERUM sostiene inoltre che ogni malato esisterebbero ben 200 portatori sani, esistendo diversi tipi alla base della eredità della malattia, e questi differenti biotipi sempre risulterebbero bene evidenziati nei fenotipi (SCHULTE).

Certamente per poter comprendere il vasto problema genetico di epilessia occorre allargare il campo della ricerca anche verso alcu forme psicopatiche (alcoolismo, narcisismi, idiozia, prostituzione, minalità, ecc.). Il WEEKS su 5533 familiari di epilettici, ha potuto in viduare ben 700 epilettici, 350 idioti, 162 psicopatici, 353 alcoolizza 131 emicranici. Simili resultati sono stati osservati anche da STROESS SER con 70% di eredità neuropatica nei familiari di epilettici. Co osserva il FRANZI bisogna considerare sempre tutte le forme affini lettoidi, e mai la sindrome classica soltanto. Lo STRAUDER ritiene ch gene patogeno debba possedere una forte penetrazione nel fenoti come si osserva più agevolmente nelle forme miocloniche (LUNDB HANHART, PINTUS, ecc.), che si trasmettono chiaramente con erec monomera.

Devesi tener conto anche che l'epilessia si manifesta secondo alc statistiche più del doppio nel maschio che nella femmina, e ciò ver milmente non forse per relazione con l'eterocromosoma, quanto per l'a biente endogeno di esplicazione umorale (androgeni) e per le influe esterne (alcool, ecc.). LENNOX (1951) e collaboratori attraverso numer ricerche genetiche ed elettroencefalografiche sono arrivati alla con sione che l'epilessia dipende da una disritmia cerebrale che si trasm come un carattere autosomico dominante con un grado di espressiv clinica molto variabile. È stato notato che soltanto il 5% dei casi presentano le onde cerebrali anormali manifestano una epilessia cli camente evidente. LENNOX e GIBBS (1940) constatarono fra i parenti epilettici il 60% di anormali nei tracciati elettroencefalografici, men nei parenti di soggetti normali solo il 10% risultavano portatori disritmie cerebrali. Analogo problema si presenta per la corea di H tington (GIBBS, PATERSON, BALDES, ecc.) affezione eredodegenerativa sistema nervoso, caratterizzata da movimenti involontari e da deme progressiva, che compare verso i quaranta anni e oltre e si trasm in dominanza regolare. Con l'esame elettroencefalografico dei bam discendenti da tali soggetti affetti, si notano delle caratteristiche sritmie che fanno prevedere la possibilità dell'insorgenza tardiva d sindrome.

Questi studi stanno a dimostrare che più progrediscono i mezzi d

gnostici e la semeiotica strumentale e più si allarga la possibilità di scoprire le più piccole manifestazioni subcliniche delle affezioni ereditarie: esame del sangue per le forme anemiche ed emorragiche (Silvestroni e collab.; in Gedda 1954), esami sul metabolismo per le sindromi diabetiche, uricemiche, xantomatosiche, ecc., esami dell'occhio per le forme oftalmologiche, ecc., ricercando anche le forme latenti nei portatori eterozigoti (« dépistage des héterozigotes »). La ricerca sistematica di questi segni, rilevabili solo con la moderna tecnica di laboratorio, assume una enorme importanza per la prognosi genetica e per la profilassi (Franceschetti e Klein in Gedda 1954). Purtroppo la nostra mentalità etico-sociale è ancora poco sensibile ai problemi eugenici, come altrove abbiamo accennato (Messeri 1959). A conforto della ereditarietà della malattia e della base costituzionale dell'affezione, stanno anche le recenti indagini cliniche di Pluvinage sulla incidenza dell'alcoolismo nella epilessia. Egli afferma che gli alcoolizzati con convulsioni epilettiche sono dei veri epilettici, anche se in condizioni normali non presentano accessi comiziali, e ciò a maggior ragione se posseggono all'esame elettroencefalografico dei tracciati anormali con disritmie. Etilismo ed epilessia sarebbero, anche secondo Bowmann e Jellinek, due conseguenze distinte della medesima disposizione ereditaria neuropatica. La funzione rivelatrice dell'alcool, secondo Lennox e Haggard, sarebbe nettissima, infatti la frequenza di epilessia in corso di etilismo abituale sarebbe del 10% e della stessa percentuale sarebbe il riscontro di disritmie cerebrali in esami elettroencefalografici effettuati a caso nella popolazione sana. Partendo da una frequenza fenotipica di 4 malati su 1000, si calcola che i portatori (eterozigoti) siano circa il 12%, il che autorizza l'ipotesi sopra accennata. Tutto ciò riconferma quanto intraveduto sul piano sperimentale dalla nostra Scuola (Amantea, Martino, Alibrandi), già sopra citato, e assume una speciale importanza nel commento conclusivo che sarà fatto alla presente ricerca genetica col test PTC.

Ricerca sperimentale

Analogamente a quanto già da noi studiato sugli schizofrenici, abbiamo cercato di indagare il comportamento della sensibilità gustativa verso il test PTC anche sui soggetti clinicamente affetti da epilessia essenziale. Per ciò che riguarda il valore tecnico del test genetico PTC (feniltiourea 0,05‰) rimandiamo a quanto detto precedentemente (Messeri 1958*b*).

È da notare che la ricerca è stata molto laboriosa perchè in genere non essendo gli epilettici ricoverati in Ospedali, è difficile poterne avere a disposizione un numero considerevole. Comunque abbiamo potuto raccogliere un notevole collettivo di malati di ambo i sessi saggiati con la PTC, alcuni reperiti nella Provincia di Firenze, altri in quella di Siena. È stata usata la solita soluzione PTC (0,05‰) secondo la tecnica del Ford, mediante istillazione di due gocce sul terzo medio del dorso della lingua. Su 100 soggetti, dei quali 39 maschi e 61 femmine, sono resultati sensibili al test (PTC +) 74, ed insensibili (PTC —) 26. Il saggio fatto in Toscana su 300 individui sani ha dato rispettivamente il 32,7% di insensibili e il 67,3% di sensibili.

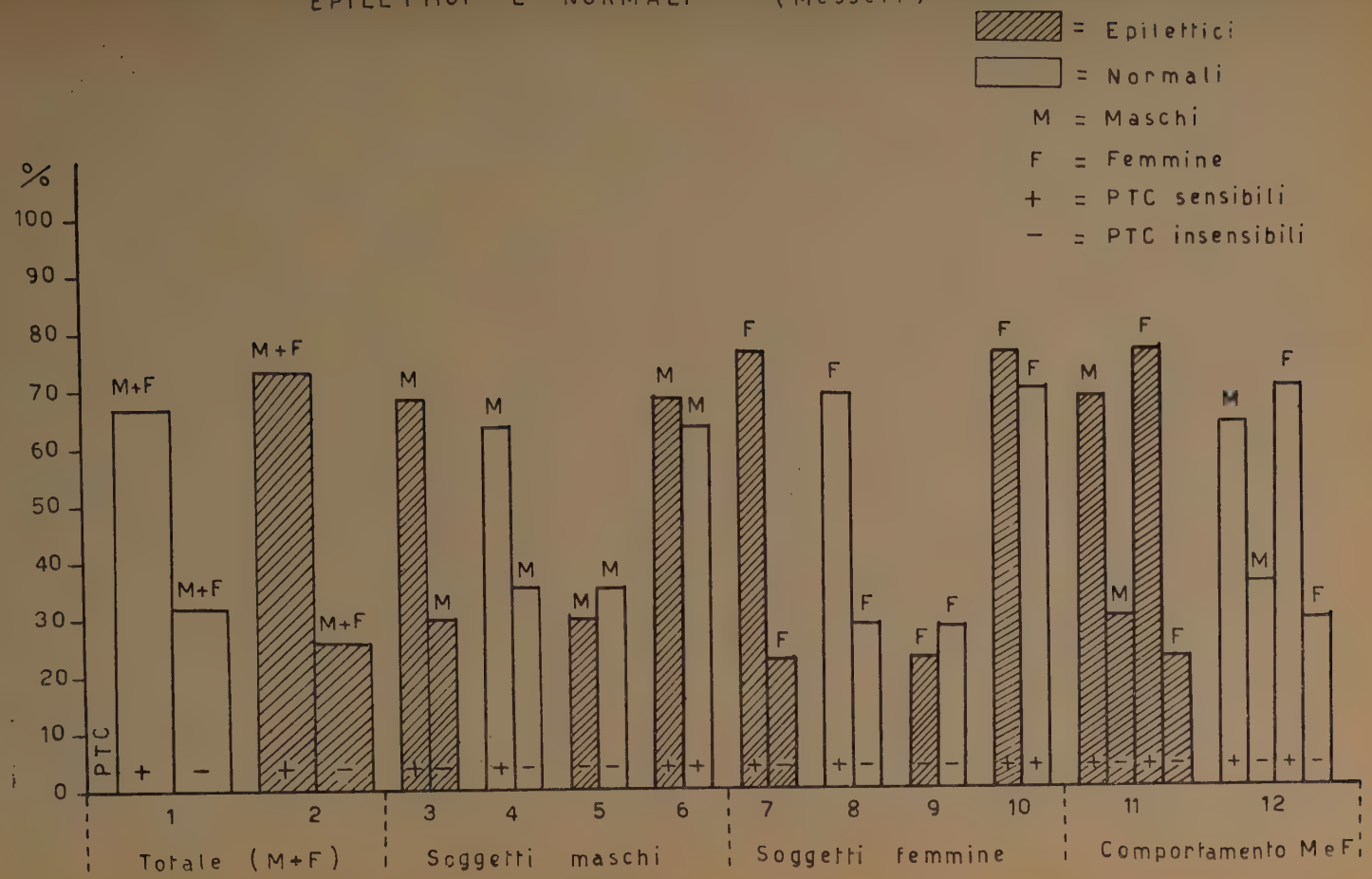
L'indagine diviene più interessante e complessa se si distingue il campione maschile da quello femminile. È stato notato a questo proposito fra gli uomini malati: 27 sensibili e 12 insensibili, e fra le donne malate: 47 sensibili e 14 insensibili, pari rispettivamente al 69,20% PTC + e 30,80% PTC — nei maschi, e al 76,04% PTC + e 22,96% PTC — nelle femmine. Riassumiamo sinteticamente i dati da mettere a confronto nella tabella seguente (Tab. I) e graficamente rappresentati nel diagramma (fig. 1). A proposito degli istogrammi illustrativi sul comportamento studiato nei soggetti malati e sani devesi osservare che il raffronto fra le due serie di PTC + e PTC — nei maschi e nelle femmine è arbitrario in quanto ciò rappresenta un confronto effettuato non fra due percentuali di valori di un totale = 100.

TABELLA I

Epilettici	N. saggiati	PTC+	PTC—	%PTC+	%PTC—
Maschi	39	27	12	69,20	30,80
Femmine	61	47	14	77,04	22,96
Totale	100	74	26	74	26
Normali					
Maschi	150	202	54	64	36
Femmine	150	106	44	70,7	29,3
Totale	300	96	98	67,3	32,7

Fig. 1. — Istogrammi delle frequenze dei sensibili o meno al test PTC nel collettivo dei sani e degli epilettici, e nei due sessi separatamente.

EPILETTICI E NORMALI (Messeri)



Gli istogrammi rappresentano in percentuale la frequenza delle d categorie (sani e malati) di soggetti sensibili (+) ed insensibili (—) al soluzione standard della PTC nei collettivi (n. 1 e 2). Inoltre nei di sessi, con distinzione fra malati e sani, ed in particolare per i maschi grafico considera la frequenza dei PTC + e PTC — nei malati (n. 3) nei sani (n. 4), inoltre nella categoria dei PTC — i maschi malati e sa (n. 5) e nella categoria dei PTC + i maschi malati e sani (n. 6). Per femmine esamina la relativa frequenza (nn. 7, 8, 9, 10) suddivisa con nel grafico precedente. Il grafico successivo considera invece il compo tamento dei soggetti malati nei due sessi e nelle due categorie di PTC e PTC — (n. 11) e dei soggetti sani analogamente (n. 12).

Considerando l'evoluzione del fenomeno nei due gruppi di perso si nota che la sensibilità alla PTC risulta lievemente diversa negli ind vidui epilettici rispetto ai normali, con un divario del 6,7% di mino positività nei normali, ed uguale differenza di minore negatività fra malati. Analizzando separatamente nei due sessi si nota che la sen bilità alla PTC, aumentata nel collettivo dei malati, è dovuta più a femmine che ai maschi e viceversa la insensibilità. Pertanto esiste u minore negatività (PTC —) fra i malati che fra i sani, più accentua fra le femmine (6,70%) che fra i maschi (5,20%). Inoltre se si osser l'andamento del fenomeno fra i malati ed i sani si nota che nei primi sensibilità alla PTC si sposta in ambedue i sessi verso la positività, m mentre questo aumento nelle femmine è del 6,7%, nei maschi è del 5,2% fra la popolazione normale esiste uguale scarto di maggiore positivi nelle femmine 6,7%; questo stato di cose si altera negli epilettici n senso che aumentano i soggetti PTC + tanto fra i maschi che fra femmine.

Nella tabella che segue schematizziamo le differenze sessuali, ra gruppando i soggetti saggiati, fra i normali e gli epilettici, nelle d categorie di PTC + e PTC — e nei due sessi (Tab. II).

TABELLA II

Soggetti saggiati	Maschi	Femmine	Differenza in più M. F.
Normali PTC+	64%	70,7%	+6,7 F. sensibili
Normali PTC—	36%	29,3%	+6,7 M. insensibili
Epilettici PTC+	69,20%	77,04%	+7,84 F. sensibili
Epilettici PTC—	30,80%	22,96%	+7,84 M. insensibili

Facendo i rapporti fra le due percentuali di PTC — si può osservare che le donne insensibili sono sempre meno degli uomini con scarsa differenza, sia fra i sani che fra i malati. L'ipotesi già proposta che il fattore PTC sensibilità possa servire quale «elemento marcato» per poter seguire i movimenti del fattore schizofrenico (MESSERI, *Caryologia*, XI, 1958), non può essere avanzata anche nei riguardi della epilessia, in quanto la differenza fra i collettivi nelle due serie di malati di sani, non è affatto significativa, per quanto presente, (6,7%) e lo stesso nei due sessi aggirandosi dal 6,7% al 7,8%. A questo punto ci sembra utile di confrontare la tabella precedente con quella analoga che riporta i dati del nostro studio sulla schizofrenia (MESSERI, *Caryologia*, XI, 1958, pag. 237) (Tab. III).

TABELLA III

Soggetti saggiati	Maschi	Femmine	Differenza in più M.F.
Normali PTC+	64%	70,7%	+6,7 F. sensibili
Normali PTC—	36%	29,3%	+6,7 M. insensibili
Schizofrenici PTC+	10%	55%	+45 F. sensibili
Schizofrenici PTC—	90%	45%	+45 M. insensibili

Nel caso della schizofrenia è stato utile saggiare con la elaborazione statistica dei dati, la significatività dei vari aspetti dell'esperienza, presupponendo una correlazione fenotipica fra schizofrenia e sensibilità alla PTC. A tale proposito è stato confermato, utilizzando il test χ^2 per il confronto di due distribuzioni empiriche, che la significatività è massima fra il collettivo sano e quello malato e fra malati maschi e femmine, e fra malati maschi e sani, e con sufficiente grado anche fra femmine malate e sane, mentre è risultato del tutto insignificante il rapporto fra uomini e donne sani. Nella ricerca sulla epilessia (Tab. II) appare a prima vista non significativo il rapporto fra i valori analoghi su citati, e pertanto le lievi differenze esistenti in questa ultima ricerca possono essere considerate di ordine casuale.

CONCLUSIONI

È da notare anzitutto che appare molto probabile che le differenze di frequenza fra uomini e donne sani riguardo alla sensibilità alla PTC

siano dell'ordine dei fattori accidentali, quantunque ciò potrebbe esse determinato da una differenza reale, ma non statisticamente signific tiva, perchè troppo esigua. Analogamente è da considerare a proposi del collettivo dei soggetti malati di epilessia.

Ritornando a quanto citato prima, noi siamo indotti a considera il problema della eredità epilettica sotto una luce diversa da quella c gli studi moderni hanno proiettato sul problema di altre affezio neuropatiche.

Già abbiamo accennato all'ipotesi che la variazione di sensibili alla PTC, in generale considerata da tutti un carattere ereditario siologico, venga ad assumere in seguito alle nostre ricerche un valo sempre più patologico. Ciò ci riporta alla moderna teoria dello Sp RANSKIJ, il quale sostiene che la patologia non rappresenta soltanto disorganizzazione della coordinazione fisiologica, ma la creazione condizioni nuove, sconosciute alla fisiologia, e sostenute sopratutto dal componente nervosa dei processi patologici. L'omozigosi PTC— è sta da noi considerata come indice di un « genotipo parapatogeno » in quan verosimilmente costituisce il substrato di uno speciale « terreno cost tuzionale » favorente l'insorgenza di note cliniche di sindromi ereditari e altrimenti destinato alla latenza fenotipica (diabete, schizofrenia Mentre su base metabolica e quindi biochimica, esiste una analogia pat genetica fra diabete e schizofrenia (BUSCAINO 1958), a cui corrispon analogia verso il test PTC (MESSERI 1958c), su base anatomica invec vale a dire nei riguardi della comune sede d'impianto dell'affezione sch zofrenica ed epilettica, non corrisponde analogia di comportamento ver il test PTC, pur essendo visibile un particolare orientamento, nel prima con valori differenziali altissimi e nella seconda con valori appe evidenti rispetto ai soggetti normali. Ciò potrebbe rivestire una notevo importanza non solo genetica, ma anche etiologica, in quanto si potreb pensare che alla base di questo fenomeno esistano per la schizofrenia per il diabete mellito geni che proiettano la loro ombra sul fenotipo, so se agenti in un ambiente endogeno caratterizzato dalla nota dismet bolica glucidica, alla quale è verosimilmente correlata la sensibilità al PTC; mentre per l'epilessia il gene, o gruppi di geni corresponsabil agiscono sul fenotipo, indipendentemente o quasi dall'ambiente end geno (di cui sarebbe rivelatore il test PTC), risentendo invece molto sollecitazioni esterne, quali le intossicazioni alimentari (ALIBRANDI) sopratutto quelle alcooliche (PLUVINAGE 1958), agendo spesso queste s stanze da rivelatori fenotipici della sindrome epilettica.

È da notare inoltre che la valutazione della intensità di interazione ra eredità ed ambiente (HOLZINGER 1949, VERSCHUER 1949) ha portato a conoscere con un certo grado di approssimazione il «rapporto» fra questi due elementi (A : E), che risulterebbe molto diverso per esempio per i gruppi sanguigni (A : E = 0 : 1), il piede equino (A : E = 3 : 4), il rachitismo (A : E = 1 : 6) e l'epilessia (A : E = 1 : 13) (VERSCHUER 1949). Quest'ultima malattia risulta pertanto, in base a queste osservazioni, molto sensibile alla eredità e scarsamente influenzata da fattori ambientali o accidentali, il rapporto 1 : 13 non significa però che questi 13 individui siano geneticamente sani, in quanto potrebbero essere in parte eterozigoti portatori, e su questi probabilmente agirebbe la rivelazione fenotipica indotta dall'alcool. A questo proposito la semeiotica moderna, come abbiamo già accennato, è oggi capace di scoprire i portatori sani per alcune sindromi ereditarie, nel caso particolare con la ricerca elettroencefalografica.

I geni responsabili della sensibilità alla PTC in conclusione sarebbero praticamente estranei alla costituzione epilettoide, mentre sarebbero attivi rispetto allo stato dismetabolico glucidico (TERRY, SEGALL, MESSERI 1958*b*). Ciò riconfermerebbe sperimentalmente anche sull'uomo che la funzione del gene è essenzialmente biochimica e probabilmente di natura enzimatico-catabolica. Qualora la serie reazionale del gene epilettogeno venisse inibita, o esaltata dall'attività del gene PTC sensibilità, solo allora se ne vedrebbe la correlazione positiva o negativa nel fenotipo (clinicamente), ciò che evidentemente non accade nella epilessia, per la mancanza di un adatto substrato chimico endogeno (2).

Infine è da notare che queste ricerche sperimentali tendono a dimostrare che anche nel campo genetico è possibile mettere in evidenza rispetto ad uno stesso «test» concordanze di affezioni che clinicamente sono state sempre raggruppate e classificate, per sede anatomopatologica o per sintomatologia, molto diversamente; (schizofrenia e diabete); il che può illuminare sopratutto lo studio della eziopatogenesi e la ricerca della terapia. Anche le osservazioni di iso- od eterofrequenze comparate, nella loro distribuzione geografica, può agevolare lo studio di alcune malattie (diabete, tumori, t.b.c., ecc.) secondo il «metodo patoecologico» (MESSERI 1959), pensando che l'ambiente agisca, in tali casi, come

(2) Come gli epilettici si comportano anche i sordomuti rispetto alla sensibilità alla PTC, come risulta dalle nostre esperienze eseguite a Siena, col gentile aiuto del compianto P. MUCCI, insegnante dell'Istituto Pendola.

un test rivelatore di smistamenti frequenziali, agendo su particolari in granaggi della lunga catena patogenetica di queste affezioni. Per quest argomento rimandiamo a quanto è stato estesamente trattato altrov (Messeri 1959). È da notare che queste correlazioni fra patogenesi e ambiente, spesso neanche sospettate, costituiscono elementi chiarifica tori per alcuni problemi della moderna patologia.

BIBLIOGRAFIA

Boyd W. C., 1950. — *Genetics and the race of Man*. Little, Boston.

Buscaino V. M., 1958. — *Epilessia*. Gazzetta Sanitaria, **1**: 20-25.

Colin E. C., 1956. — *Elements of Genetics*. Hill Book, New York.

Darlington C., 1954. — *I fenomeni della vita*. Macrì, Firenze.

Ford E. C., 1948. — *Genetica*. Longanesi, Milano.

Franzi L., 1941. — *L'eredità in patologia*. Arti Grafiche, Varallo Sesia.

Gates R. R., 1946. — *Human genetics*. Mac Millan, New York.

Gedda L., 1951. — *Studio dei gemelli*. Orizzonte medico, Roma.

—, 1954. — *Genetica medica*. Istituto Mendel, Roma.

Gianferrari L. e Cantoni G., 1942. — *Manuale di genetica*. Vallardi, Milano.

Kallmann F., 1959. — *Heredity in Health and mental disorders*. New York.

Kalmus H., 1953. — *La genetica*. Bompiani, Milano.

Martino G., 1958. — *Elementi di Fisiologia*. Principato, Messina.

Messeri E., 1955. — *Ecologia umana*. Archivio Antropol. Etnol., **85**: 17-81.

—, 1957. — *Influenze cosmiche e suicidi*. Atti Acc. Naz. Lincei, Rend. Sc. Nat., **22**: 12-1

—, 1958*a*. — *Fattori ereditari nell'uomo*. Caryologia, **10**: 443-449.

—, 1958*b*. — *Sensibilità PTC nel diabete*. Caryologia, **11**: 7-27.

—, 1958*c*. — *Sensibilità PTC nella Schizofrenia*. Caryologia, **11**: 229-246.

—, 1959. — *Patoecologia*. Archivio Antropol. Etnol., **89**: 1-14.

Parenti R., 1955. — *Biologia delle Razze Umane*. Goliardica, Pisa.

Pende N., 1939. — *Trattato di biotipologia*. Vallardi, Milano.

Pluvinage R., 1958. — *Epilessia ed etilismo*. Monde medic., **67**: 2244-2248.

Silvestroni E. *et alii*., 1954. — In Gedda 1954.

Stern C., 1949. — *Human Genetics*. Freeman, S. Francisco.

Speranskij A. B., 1956. — *Fondamenti per una teoria in medicina*. Einaudi, Torino.

Sutter E., 1951. — *Eugenique*. Presses Universitaires, Paris.

Touraine A., 1955. — *Hérédité in medicine*. Masson, Paris.

Verschuer O., 1949. — *Die Zwillingforschung*. ASS, Bologna.

SUMMARY

The Author has tasted 100 individuals affected from Epilexy with P.T.C. and has ompared the results with those obtained from normal population. The Author has ompared the behaviour of Epilectict subjects with that of Schizofrenic and Diabetic nes, examined before with the same test.

RIASSUNTO

L'Autore ha saggiato col test P.T.C. cento malati di epilessia genuina e confrontato dati relativi con quelli raccolti sulla popolazione sana. Le osservazioni fatte sugli pilettici sono state confrontate con quelle analoghe eseguite sugli schizofrenici e i liabetici.

DILETTO QUATTRINI

OSSERVAZIONI SU UN PASSAGGIO DI RIBONUCLEOPROTEINE DAL CITOPLASMA AL NUCLEO E SU UN GRUPPO DI NEURONI SECERNENTI NEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE DEI MOLLUSCHI GASTEROPODI

(con Tavole LV-LX) *

In redazione: il 18 gennaio 19

Nelle cellule nervose centrali di varie specie di Gasteropodi Polm nati e Pseudopolmonati illustrai qualche tempo fa (QUATTRINI 1959 1959*b*) dei quadri che sembrerebbero indicare un passaggio, a livello m croscopico, di materiali citoplasmatici nel nucleo e rilevai pure che det materiali almeno in molti casi si presentano nel nucleo stesso con l'aspe to e la struttura dei comuni nucleoli. Il reperto era imprevedibile e dat l'interesse che esso riveste, anche se dovesse trattarsi di un esempio d tutto isolato ed eccezionale, ho a tale proposito condotte ulteriori ricer che, estendendo le mie osservazioni a tutte le specie di Gasteropodi di cu mi è stato possibile disporre. Ne riferirò in questo lavoro i resultati o tenuti.

Nel corso di tali ricerche, in diverse specie da me prese in esame h inoltre riscontrato un gruppo di neuroni secernenti, dei quali mi è sem brato opportuno dare qui una breve descrizione anche perché in essi s osservano a volte particolarmente accentuati ed evidenti alcuni dei qua dri che verranno in seguito illustrati.

MATERIALI E TECNICA

Hanno costituito oggetto di studio varie specie di Gasteropodi Pol monati appartenenti alle Famiglie *Limacidae, Helicidae, Testacellidae Clausiliidae, Zonitidae, Stenogyridae* e *Limnaeidae,* oltre a due specie d

* Istituto di Anatomia Comparata della Università di Firenze, diretto dal Prof. E PADOA.

'seudopolmonati della Famiglia *Vaginulidae* (1) e a due di Prosobranhi (2).

Nel clausilide *Papillifera bidens* (L.) ho preso in esame esemplari dulti ed altri in stadi diversi, ed anche assai precoci, dell'accrescimento omatico. Per le specie *Helix aspersa* Müller e *Limax maximus* L. ho puto disporre pure di animali allo stato embrionale, sacrificati a varia listanza dal giorno della deposizione delle uova. In tutti gli altri casi ho atto le mie osservazioni soltanto su animali adulti.

Il materiale di studio proveniva da varie località e venne raccolto lai primi di luglio alla fine di dicembre. Dirò subito che nei diversi mesi ell'anno non ho in esso riscontrato divergenze di notevole rilievo.

Il sistema nervoso centrale fu fissato nei liquidi di Bouin, Carnoy, anfelice, Zenker (formolico o acetico), Gendre, Hollande, Duboscq-Brasil, nonchè in formalina al 10% e in alcool a 80° o a 95°. Esso venne empre incluso in paraffina e tagliato in serie complete di fette dello pessore di 5-8 micron. Per lo più le serie furono colorate con il verde di metile-pironina del metodo Pappenheim-Unna (preceduto o meno da trattamento con la ribonucleasi, secondo la tecnica di Brachet) e con la reazione di Feulgen per l'acido desossiribonucleico. Una parte di questo fu inoltre colorata con la comune ematossilina-eosina, con il metodo di Nissl per la sostanza cromofila, con il Mallory originale, con il Mallory-Vannucci, con il Rasmussen-Ignesti, con il Gomori per i granuli di neurosecreto, con la fucsina-paraldeide dopo ossidazione permanganico-solforica e con la tecnica di Hotchkiss-Mac Manus per i polisaccaridi. Su alcuni preparati vennero fatte, inoltre, osservazioni in contrasto di fase e al microscopio polarizzatore.

Per i fini che mi sono principalmente proposti in questo lavoro, ho ottenuto i resultati più brillanti su materiale fissato in Bouin o in Hollande e colorato con il verde di metile-pironina.

La struttura delle cellule nervose, e in particolar modo l'aspetto del citoplasma, del nucleo e dei nucleoli, presentano delle divergenze più o meno notevoli nei Limacidi, rispetto agli altri gruppi di Gasteropodi Polmonati, agli Pseudopolmonati ed ai Prosobranchi e per questo li prenderò qui in esame separatamente.

---

(1) *Vaginulus borellianus* (Colosi) e *Laevicaulis alte* (Férussac), messe a mia disposizione dal Prof. Colosi, che desidero qui vivamente ringraziare.

(2) *Patella coerulea* L. e *Cyclostoma elegans* (Müller).

Osservazioni sui limacidi

In tutte le specie, e in particolar modo in *Milax gagates* (Drapa naud), ho sempre riscontrato dei quadri del tutto simili a quelli già co me posti in evidenza nei lavori citati e che sembrerebbero indica un passaggio di ribonucleoproteine (RNP) dal citoplasma al nucle Alcuni di essi sono riprodotti nelle microfotografie delle Tavole LV LVI. Come mostrano le figure di dette Tavole, nella regione del citopla sma prospiciente il nucleo sono presenti dei lobi in numero vario e di a sai varia grandezza. Ciò si verifica più spesso e con particolare evidenz nei pirenofori di maggior mole (con oltre 50 micron di diametro medio) si tratta senza alcun dubbio di un fenomeno transitorio, perché in cellu del tutto corrispondenti può non riscontrarsi nulla di simile in altr esemplari della medesima specie, fissati e colorati con identiche tecnich istologiche.

Neuroni con citoplasma in tal modo lobato li ho osservati in tutt le regioni del sistema nervoso centrale, con la sola eccezione del procer bro, il quale è però, come è noto, formato quasi soltanto da neuroni mole estremamente modesta (con pirenofori di 4-7 micron di diamet medio, nelle diverse specie da me studiate) e con una quantità assai lim tata di citoplasma. Essi si incontrano più di frequente nei gangli dell massa nervosa ventrale, ove peraltro sono più numerose le cellule grande e grandissima mole. Nell'ambito di tutto il sistema nervoso loro numero non è mai molto elevato e può del resto variare anche n tevolmente in differenti esemplari della stessa specie.

I lobi appaiono talvolta più o meno allungati e connessi al citopl sma da una specie di peduncolo (Figg. 8, 10, 11, 15); e sebbene sia ovvi mente difficile giudicare del loro ulteriore destino dall'esame di materi le non vivente, alcune delle immagini da me osservate sembrerebbero i dicare che tale peduncolo gradatamente si assottiglia, fino a perdere og connessione con il citoplasma stesso (Figg. 5, 6), anche perchè posson riscontrarsi in tal senso tutti i possibili termini di passaggio. Interna mente al nucleo, almeno in alcuni casi, il peduncolo in seguito di nuov scompare, come attesta il fatto che possono talvolta ritrovarsene più meno evidenti tracce (si osservi, ad esempio, la Fig. 3); i singoli lobi te dono allora a riprendere una forma rotondeggiante e non sono riconosc bili dai comuni nucleoli.

Più di frequente i lobi si liberano nel territorio nucleare con una m dalità un poco diversa: essi si strozzano o si recidono lungo la loro ba

'impianto sul citoplasma stesso, senza che vi compaia un evidente peuncolo e senza modificare molto la loro forma originaria (Figg. 1, 4, 7, 2, 13).

Talvolta delle lobature citoplasmatiche particolarmente numerose ed vidienti si riscontrano in un gruppo di neuroni che si distinguono da utti gli altri per vari dettagli della loro struttura e in special modo erchè di norma vi si osservano segni manifesti di una intensa attività seretoria (Figg. 7, 9). Si tratta di un insieme di grosse cellule nervose, pote unilateralmente e asimmetricamente in uno dei gangli della massa ervosa ventrale (Il ganglio è situato a sinistra ed è probabile che sia uno lei due parietali). Tutte queste cellule, come del resto notoriamente si erifica per la grande maggioranza dei neuroni centrali sia dei Gasteropodi che di numerosi altri gruppi di Invertebrati, sono unipolari. I loro rolungamenti si riuniscono in un fascio unico (Figg. 17, 19, 20, 21), il uale, dopo aver attraversato il ganglio mantenendosi sempre compatto, sce dal sistema nervoso centrale e si perde in un nervo che presenta un lecorso piuttosto lungo e complicato e che mi è stato possibile seguire ino in prossimità dell'aorta. Come ho sopra accennato, in queste cellule si notano di regola, e spesso in forma assai vistosa, dei fenomeni di secrezione. Una parte del secreto è talvolta presente in finissimi granuli, na in quantità assai maggiore io l'ho sempre osservato in gocce di dimensioni varie e per lo più relativamente notevoli (Figg. 17, 20, 21, 33). Non mi sembra che vi sia dubbio che si tratti di una neurosecrezione. Il neurosecreto presenta qui, però, differenti affinità tintoriali, se confrontato con quello ben noto sia in molti altri Invertebrati che nei Vertebrati in genere. In particolare rileverò che esso non si colora affatto con la ematossilina cromica del classico metodo di Gomori (Fig. 33) e neppure con la fucsina-paraldeide dopo ossidazione permanganico-solforica; è inoltre sempre paS-negativo (Fig. 19), Feulgen negativo (Fig. 17) e per lo più del tutto pironinofobo (Fig. 9); a volte con la pironina, specialmente nelle gocce di volume maggiore, si vede che la regione centrale delle gocce stesse assume una lieve ma evidente tinta rosea, mentre ciò non si verifica mai nella loro zona più periferica. In tutto il materiale da me preso in esame il secreto si colorava invece intensamente con la fucsina acida del metodo Rasmussen-Ignesti (Figg. 20, 21) e veniva anche abbastanza bene messo in evidenza dalla floxina (Fig. 33) e dall'orange.

Granuli e gocce di neurosecreto appaiono a volte situati entro i prolungamenti cellulari, a partire dal loro cono di uscita dai singoli pirenofori; più di frequente, però, essi si osservano al di fuori dei prolungamenti stessi e, circostanza curiosa, soltanto in casi assai rari ne ho tro-

vata qualche traccia nel citoplasma, ove peraltro debbono presumibi mente prendere origine (Figg. 20, 21, 33).

I prodotti della neurosecrezione non si vedono mai uscire dal fasci formato dall'insieme dei prolungamenti cellulari (Figg. 17, 20, 21). Si sotto la forma di gocce che di granuli, essi sono molto più abbondan nella regione prossimale del fascio stesso e in particolar modo nelle im mediate adiacenze dei pirenofori dai quali esso prende origine; se n trovano sempre, però, anche lungo il tratto rimanente del suo decors entro il sistema nervoso centrale (si osservi, a tale proposito, la Fig. 21 Al di fuori del sistema nervoso centrale i reperti in tal senso si fanno sem pre più rari man mano che il nervo in cui, come ho sopra rilevato, penetr il fascio di neuriti si allontana dalla massa gangliare; il secreto appar qui di norma in fini granuli, i quali in tutto il materiale da me preso i esame, si presentavano sempre più rarefatti, fino a scomparire del tutt prima ancora che il nervo stesso fosse pervenuto al suo territorio di in nervazione.

Osservate al microscopio polarizzatore le gocce di neurosecreto ap parivano formate da un nucleo centrale monorifrangente, avvolto da u sottile coating di materiali birifrangenti.

In complesso si tratta qui con ogni probabilità di una secrezione d natura proteica i cui prodotti vengono almeno in parte sicuramente con vogliati, lungo un fascio di neuriti, al di fuori del sistema nervoso cen trale. Ho in corso altre ricerche per precisarne ulteriormente la natur chimica, le modalità con le quali essa prende origine e, se possibile, significato funzionale.

Tutti i quadri sopra illustrati, e riprodotti nelle microfotografi delle Figg. 9, 17, 19, 20, 21 e 33, si riferiscono ad esemplari di *Mila gagates*. Anche nelle altre specie di Limacidi da me studiate si trova u gruppo di neuroni secernenti nella medesima posizione e senza dubbi omologhi. In essi ho tuttavia sempre riscontrato una quantità assa minore di neurosecreto, e per lo più in forma di minutissimi granuli.

Come è ben noto, ammassi di cellule neurosecretrici, peraltro co una diversa ubicazione nell'ambito del sistema nervoso centrale e talvo ta con diverso aspetto morfologico, sono state in passato più volte os servate e descritte in varie specie e in diversi gruppi di Molluschi (i particolar modo nei Prosobranchi, Opistobranchi e Bivalvi; ma anch nei Cefalopodi e negli Scafopodi). Fra gli altri, ricordo a tale proposit i lavori di Gabe (1949, 1951, 1953, 1954, 1955), Lemche (1955), Wels (1956) e degli Scharrer (1935, 1937, 1945, 1953, 1954, 1955). Nei Gaste

odi da me presi in esame non mi resulta però che siano stati prima malati.

Per la loro posizione asimmetrica i neuroni in oggetto ricordano un gano nervoso formato da un gruppo di cellule a limiti indistinti, di etto sinciziale, da me già illustrato (QUATTRINI 1958) nel ganglio parie- e destro di *Papillifera bidens* e di altre specie di Clausilidi e che qui roduco nella Fig. 18. La somiglianza è resa ancor più evidente dal to che in ambedue i casi tutti i prolungamenti cellulari si riuniscono ormare un solo fascio (nei Clausilidi di frequente essi parrebbero addi- tura del tutto fusi in un prolungamento unico) e il citoplasma si pre- nta di regola estesamente vacuolizzato e con aspetto diverso da quello e di norma si osserva nelle altre cellule nervose (si confronti la Fig. 18 n le Figg. 17, 19, 20 e 33). Si tratta di strutture omologhe? Può darsi. rto è, però, che nel caso dei Clausilidi le cellule appaiono, come ho ri- rdato, costantemente fuse a formare un sincizio e non ho mai riscon- ato in esse traccia alcuna di neurosecrezione, mentre nei Limacidi ntengono sempre del neurosecreto e, sebbene anche qui i pirenofori mbrino talvolta reciprocamente uniti da travate più o meno sottili citoplasma, non vi ho mai osservato una struttura sinciziale altret- nto manifesta.

Oltre a cellule con le lobature citoplasmatiche in precedenza de- ritte, nel tessuto nervoso dei Limacidi possono riscontrarsene altre e presentano in tal senso un quadro in apparenza assai diverso, ma e ritengo opportuno illustrare, perché non è forse improbabile che bia un analogo significato: Sempre nella regione prospiciente il nu- eo, si osservano nel citoplasma delle incisure in numero vario e più meno profonde dalle quali esso rimane come suddiviso in una specie tenui filamenti o di lamine sottili che gli conferiscono, in complesso, n tipico aspetto trabecolato (Fig. 26). Quando le incisure sono fra ro molto vicine ed hanno tutte una profondità pressoché eguale il ci- plasma stesso appare come finemente ciliato.

A volte ciò si verifica lungo tutta la superficie del citoplasma; nella aggior parte dei casi un aspetto simile l'ho però riscontrato soltanto tratti variamente estesi di questa (Fig. 26). Quadri del genere si os- rvano più spesso nei pirenofori di maggior mole, ma possono anche ssere presenti in cellule di dimensioni relativamente modeste; come irò meglio in seguito, essi sono in particolar modo numerosi ed evi- enti nelle altre Famiglie di Gasteropodi Polmonati da me presi in same.

Fini trabecole come quelle in oggetto si notano talvolta isolate i
ternamente al nucleo, senza alcun diretto rapporto con il citoplasm
dal quale esse sembrerebbe pertanto che, almeno in alcuni casi, si
staccassero per migrare nel territorio nucleare, analogamente a quan
come ho sopra rilevato, si verifica per i lobi di mole maggiore.

Noterò infine che, mentre in molti casi la membrana nucleare
vede ovunque continua e ben demarcata, in altri essa appare, a trat
molto meno evidente e talvolta non è addirittura riconoscibile, qua
che vi si formino come delle soluzioni di continuità, attraverso le qual
materiali citoplasmatici e nucleari vengono ad immediato contatto.

Segnalerò qui pure un altro quadro che si riscontra talvolta
neuroni centrali dei Limacidi e che non avevo illustrato nelle note
tate. Esso è riprodotto nelle Figg. 2, 25, 28, 29, 30, 35, 38, 39 e 40.
caratterizzato dal fatto che masse di citoplasma di dimensioni per
più assai notevoli protrudono nel nucleo. In qualche caso esse sono
tondeggianti e ricordano allora in tesi generale i lobi precedentemen
descritti, salvo però a differirne fra l'altro per la mole di gran lun
maggiore (Fig. 30); più spesso appaiono informi e con aspetti morfo
gici diversi nelle diverse cellule (Figg. 2, 25, 28, 29). Detti ammassi
materiali citoplasmatici di frequente all'interno del nucleo si vedo
come fratturarsi in blocchi di dimensioni sempre più modeste, fino
ricordare quelle tipiche dei nucleoli. Scorrendo le serie delle sezi
microscopiche si vede che alcuni di questi blocchi sono ancora amp
mente uniti al resto del citoplasma, dal quale inoltre non differisco
molto per l'aspetto e la struttura. Ma in altri casi non c'è dubbio c
tale connessione si verifica soltanto in tratti di ampiezza assai limitata
osservino, ad esempio, le Figg. 2 e 25) e in altri ancora non è più ri
noscibile (si vedano specialmente le Figg. 28, 39, 40).

Anche i quadri sopra descritti sembrerebbero quindi indicare,
meno in alcuni casi, un passaggio di materiali citoplasmatici all'inter
del nucleo; passaggio che, inoltre, può qui rilevarsi anche ad ingran
menti assai modesti e che si presenta direi in modo particolarmente
stoso. Da notare anche che man mano che detti materiali si prepara
a migrare nel territorio nucleare mostrano per lo più affinità tintori
e struttura visibilmente diverse da quelle che si osservano nelle alt
regioni del citoplasma stesso (Figg. 2, 29).

Sia i lobi che le trabecole ed i blocchi di citoplasma, in tutto il m
teriale da me preso in esame erano Feulgen-negativi e mostravano

to contenuto in acido ribonucleico (RNA), di frequente più elevato
e in qualsiasi altra regione del citoplasma stesso. Con la pironina e
n il bleu di toluidina del metodo di Nissl essi mostravano infatti, in
olti casi, una colorazione decisamente più intensa. Trattati con la ri-
onucleasi secondo la tecnica di Brachet, la loro pironinofilia di norma
ompariva più tardi di quella del resto del citoplasma e spesso contem-
oraneamente o quasi alla pironinofilia dei comuni nucleoli, rispetto ai
uali essi mostravano quindi, in tal senso, un comportamento pressochè
guale.

I lobi prima descritti, quando si trovano uniti al citoplasma si pre-
ntano per lo più omogenei. Pervenuti nel nucleo essi assumono invece,
regola, una struttura più o meno complessa. Ciò è dovuto principal-
ente al fatto che vi compaiono spesso dei granuli e dei vacuoli. Come
altra volta a tale proposito rilevato (QUATTRINI 1959*b*), i granuli pos-
ono essere presenti in numero vario, sono in genere molto piccoli, assai
frangenti e con tutte le tecniche da me adottate mostrano di norma una
nta scura, uniforme; a volte parrebbero ulteriormente strutturati, pre-
ntando all'interno una zona di colore più tenue o che non si colora af-
tto; in quest'ultimo caso appaiono come una specie di dischi sottili,
rati al centro e ricordano alcuni inclusi endonucleolari già osservati
descritti dalla KUNZE (1921) nei neuroni centrali di *Helix pomatia*. I
acuoli si riscontrano in numero vario ed hanno assai diversa ampiezza.
ure essi si distinguono per la loro netta rifrangenza. Per lo più mo-
rano una pironinofilia più debole ed in qualche caso sembrerebbero
el tutto pironinofobi.

Una struttura praticamente eguale a quella che ho sopra descritta
riscontra in molti dei comuni nucleoli ed è noto che fu in passato il-
strata da vari AA., e in particolare da BOCHENEK (1901), LEGENDRE
1908-1909) e dalla KUNZE (1921) nelle cellule nervose di diverse specie
i Gasteropodi.

Rileverò, inoltre, che un evidente inizio di tale strutturazione si
ede talvolta nei lobi citoplasmatici, prima ancora che essi si distac-
hino dal citoplasma stesso (Figg. 10, 12, 15). In qualche caso, sia
ure assai raro, si possono addirittura incontrare lobi la cui struttura
on differisce sensibilmente da quella dei più complessi nucleoli
Fig. 15). Da notare anche che fenomeni analoghi si osservano talvolta
ure quando il passaggio di materiali dal citoplasma al nucleo sembra
he avvenga in grossi e informi blocchi. Come infatti si osserva, ad
sempio, nella Fig. 29, in alcuni di tali blocchi compaiono dei tipici

vacuoli che ricordano quelli presenti in numerosi nucleoli e che non riscontrano affatto in altre zone del citoplasma.

Osservazioni negli altri Gasteropodi Polmonati

Nelle altre Famiglie di Polmonati da me prese in esame solo ass di rado si osservano lobature citoplasmatiche delle dimensioni e con struttura di quelle precedentemente descritte. Quadri simili sono prodotti nelle Figg. 14, 16 e si riferiscono, rispettivamente, ad un esem plare di *Cochlodina laminata* Draparnaud ed uno di *Rumina decolla* L.; ma si tratta, ripeto, di reperti piuttosto eccezionali.

Numerose sono invece qui le cellule in cui il citoplasma, al limi con il nucleo, appare inciso e trabecolato; il suo aspetto è in tal ca del tutto paragonabile a quello che ho sopra illustrato in alcuni ne roni dei Limacidi (Figg. 22, 23, 36). Quadri del genere li ho riscontra con particolare frequenza negli Elicidi. Essi si osservano più spesso pirenofori di maggior mole, ma non di rado anche in cellule nervose dimensioni relativamente modeste. Nelle sezioni microscopiche incisu e trabecole appaiono talvolta su tutta la superficie del citoplas (Fig. 36), mentre in altri casi, e sono i più numerosi, si riscontrano s tanto su alcuni suoi tratti, variamente estesi (Figg. 22, 23). Ed anc in questi animali, come avviene talvolta nei Limacidi, trabecole tutto simili parrebbero a volte presenti internamente al nucleo e ser alcun diretto rapporto con il citoplasma stesso.

Pure qui le trabecole mostrano sempre un notevole contenuto RNA, di frequente più elevato che in ogni altra zona del citoplasma osservi a tale proposito la Fig. 22).

In tutte le specie della Famiglia *Helicidae* ho inoltre riscontrato gruppo di neuroni secernenti con la stessa ubicazione, e omologhi qu di, di quelli segnalati nei Limacidi. Il neurosecreto era anche in que casi presente in fini granuli o in gocce di dimensioni assai varie e t volta veramente notevoli. Rispetto ai Limacidi, ho osservato qual divergenza a carico dei pirenofori, i quali mostravano qui in gener delle dimensioni più modeste ed un citoplasma meno estesamente cuolizzato.

Rileverò infine che in tutte le specie di Molluschi in oggetto, m tre in molte delle cellule nervose la membrana nucleare si vede ovunq continua, ben demarcata e di spessore uniforme, in altre essa presen dei tratti più o meno estesi ove è meno evidente e in qualche punto n

affatto riconoscibile, quasi che vi compaiano delle soluzioni di continuità, a livello delle quali citoplasma e nucleo vengono a contatto immediato (Fig. 23).

Osservazioni sui Gasteropodi Pseudopolmonati

Esse si riferiscono a diversi esemplari di due specie della Famiglia *Vaginulidae*. Come già ebbi occasione di segnalare in uno dei lavori citati (Quattrini 1959*b*), il citoplasma di molti neuroni centrali dei Vaginulidi, nella zona prospiciente il nucleo, appare a tratti più o meno estesi inciso e frastagliato (Figg. 24, 27, 37). Il quadro è in linea generale del tutto simile a quelli descritti nelle pagine precedenti. Qui però ancora più spesso si riscontrano nei singoli neuroni incisure tutte molto ravvicinate e pressochè egualmente profonde che conferiscono al citoplasma una tipica struttura frangiata (Fig. 27). A volte le frange appaiono così sottili e numerose che il citoplasma stesso si presenta come finemente filiato. Al solito tali quadri si riscontrano più spesso e con particolare evidenza nelle cellule nervose di dimensioni maggiori. Queste cellule sono anche caratterizzate dal fatto che nei singoli nuclei sono per lo più presenti numerosissimi nucleoli, fino ad oltre un migliaio, in casi non molto rari (si osservi, ad esempio, la cellula riprodotta nella Fig. 24, nella quale si contano oltre 200 nucleoli in un'unica sezione dello spessore di 6 micron di un nucleo del diametro medio di circa 140 micron!); i nucleoli sono qui tutti di mole assai modesta e pressochè uniforme, carattere, questo, che contrassegna la totalità delle cellule nervose dei Vaginulidi, nelle quali non ho mai osservato i grossi nucleoli che si riscontrano di frequente in cellule di qualsiasi mole dei Gasteropodi Polmonati (Figg. 24, 27, 37).

Al solito le trabecole di materiali citoplasmatici mostrano anche qui un contenuto in RNA assai elevato e in molti casi sensibilmente maggiore di quello che si osserva in ogni altra regione del citoplasma (Figg. 24, 27).

Talvolta tutta la superficie del citoplasma appare uniformemente incisa o frangiata; più spesso ciò si verifica su tratti variamente estesi della superficie stessa (Figg. 24, 27, 37).

In qualche caso all'estremità distale trabecole e frange sembrano lievemente rigonfiate in minute sferule che ricordano per l'aspetto morfologico e per alto tenore in RNA i comuni nucleoli.

Anche qui la membrana nucleare si presenta talvolta ben demar-

cata su tutto il contorno del nucleo, mentre in altri casi vi si osserva delle zone nelle quali essa appare meno evidente o non è affatto ricon scibile.

Rileverò, infine, che nei Vaginulidi non ho in alcun caso osserva le grosse lobature citoplasmatiche presenti in molti neuroni degli all Gasteropodi e in particolar modo nei Limacidi; e ciò sembra in accor con il fatto che i nucleoli sono, come ho sopra ricordato, uniformeme te piccoli.

Osservazioni sui prosobranchi

Di tale gruppo di Molluschi Gasteropodi, come dissi all'inizio questo lavoro, ho preso in esame soltanto esemplari di *Patella coerul* e di *Cyclostoma elegans*. Dirò subito che in ambedue le specie non mi stato in alcun caso possibile accertare nei neuroni centrali l'esistenz di quadri in qualche modo paragonabili a quelli precedentemente ill strati. Le osservazioni in tal senso sono però qui più difficili e mi riser bo di controllarle ancora con ulteriori ricerche. La difficoltà è accr sciuta dal fatto che, a differenza di quanto si verifica negli altri Gast ropodi, il tessuto nervoso è ovunque costituito da cellule molto picco e di dimensioni quasi uniformi (Fig. 31). In particolare, non vi ho m osservato neuroni della mole veramente notevole di quelli che abbasta za di frequente si riscontrano sia nei Polmonati che negli Pseudop monati e ai quali, come ho varie volte rimarcato, si riferivano per lo p le mie precedenti osservazioni. Altre divergenze di un certo rilievo guardano inoltre la struttura del nucleo ed il numero dei nucleoli: nuclei delle cellule nervose degli altri Gasteropodi mostrano di rego un'elevata quantità di acido desossiribonucleico (DNA) e contengo assai di frequente numerosissimi nucleoli. Nei Prosobranchi invece contenuto nucleare in DNA è assai scarso ed i nucleoli sono per lo p presenti in numero di uno per ciascun nucleo (talvolta ne ho osserva 2-3; mai in numero molto maggiore). Come si vede nella Fig. 31, i n clei, inoltre, sono qui quasi sempre subsferici o ellissoidali e in nessu caso hanno forme molto irregolari; essi appaiono in generale più o m no vescicolosi e presentano in complesso l'aspetto morfologico e struttura che più comunemente si riscontrano nei neuroni di tutti g animali.

Discussione

In breve, i quadri sopra illustrati mostrano che il citoplasma di molti dei neuroni centrali dei Gasteropodi Polmonati e Pseudopolmonati nella regione prospiciente il nucleo può presentarsi con aspetti in apparenza assai diversi. Talvolta esso è lobato; altre volte più o meno finemente inciso e trabecolato; in altri casi ancora mostra delle specie di protuberanze, per lo più informi e di cospicue dimensioni, che prorudono nel territorio nucleare, del quale abbastanza spesso occupano una parte anche assai notevole (ad esempio nel caso della Fig. 30).

Per quanto riguarda i lobi (Tavole LV e LVI), a giudicare dalla loro forma (e in casi non molto rari anche dalla loro struttura), dall'alto contenuto in RNA e dal modo di comportarsi in seguito a trattamento con la ribonucleasi, non pare che differiscano dai comuni nucleoli, nei quali, pertanto, parrebbe che almeno una parte di essi sia destinata ad evolvere. A tale proposito, rileverò pure: I granuli che talvolta vi si osservano sono assai simili a quelli veduti e riprodotti da Bolognari (1959) in ovociti di varie specie di Molluschi, Echinodermi, Crostacei ed Anfibi e che questo A. considera di natura nucleolonemale. Se anche qui essi fossero elementi del nucleolonema si avrebbe ovviamente in ciò un ulteriore dato a conferma della futura evoluzione nucleolare dei lobi in oggetto.

Naturalmente ci si potrebbe chiedere se dette lobature citoplasmatiche non possano trovare una diversa interpretazione. Che si tratti, ad esempio: 1°, di un qualche fenomeno patologico; 2°, di artefatti di tecnica; 3°, di particolari aspetti di nuclei assai polimorfi; O, 4°, addirittura di quadri che sono l'espressione di un fenomeno inverso, e cioè di un passaggio al citoplasma di nucleoli o di materiali in questi elaborati.

1) Che siano da attribuirsi a fenomeni patologici è senz'altro da escludere, perché, a parte la circostanza che anche come tali sarebbero forse altrettanto singolari e imprevedibili, i quadri sopra illustrati li ho veduti in tutti i Limacidi e, sia pure con molto minore frequenza, anche in altri Gasteropodi Polmonati; e, come ho rilevato all'inizio di questo lavoro, le mie osservazioni si riferiscono a numerosi esemplari raccolti in diversi periodi di tempo ed in località varie (dai dintorni di Firenze alle Alpi Apuane).

2) Escludo pure che possa trattarsi di eventuali artefatti. In

parte perché non vedo come questi dovrebbero essersi sempre verificat soltanto in alcune delle cellule nervose e non in altre che presentan praticamente la stessa ubicazione ed una egual mole e struttura. I soprattutto perché non mi sembra probabile che essi possano presentars del tutto simili su materiali appartenenti a specie anche notevolmente diverse ed allestiti con numerosi differenti metodi della tecnica istolo gica. S'intende, poi, che io mi sono sempre preoccupato di prendere in esame quei preparati che apparivano meglio riusciti, escludendo dalle mie osservazioni quelli che non mi sembrava che dessero in tal sens una garanzia altrettanto sicura.

3) Per quanto riguarda il polimorfismo nucleare, è questo un fe nomeno che si riscontra senza alcun dubbio in numerosi neuroni di tutt i Gasteropodi, esclusi i Prosobranchi. Me ne occuperò più particolar mente in seguito. Qui mi limito soltanto a rilevare che esso si present con aspetti inconfondibili e che non mi pare che abbiano nulla a che ve dere con le lobature citoplasmatiche in oggetto.

4) Resta la eventualità che dette lobature altro non siano ch l'espressione morfologica di un passaggio di materiali dal nucleo a citoplasma. Si tratta di una eventualità teoricamente possibile, perch è ben noto che tale passaggio viene oggi ammesso, ed è stato più volt segnalato. E può darsi che anche per alcuni dei numerosi quadri da m osservati sia questa la interpretazione giusta. Il più delle volte no mi sembra però che un tal modo di vedere sia sostenibile. A parte i fatto che talvolta (ad esempio nelle immagini come quelle riprodott nelle Figg. 4, 7 e 9) un attento studio del preparato dà la precisa sensa zione, difficile anche ad esprimersi con parole, che i lobi citoplasmatic subiscano una serie di graduali modificazioni le quali, diciamo così, l preparano al loro definitivo passaggio nel nucleo, come spiegare in dett ordine di idee il fatto che non di rado quando si trovano in prossimit del citoplasma essi appaiono peduncolizzati (Figg. 5, 6)? E che un volta pervenuti nel nucleo il peduncolo sembra retrarsi sempre pi (Fig. 3), fino a scomparirne ogni traccia? Che questo si sia formato i seguito ad una specie di movimento ameboide a mezzo del quale de banali nucleoli si sposterebbero nel territorio nucleare per andare infin a mettersi in contatto con il citoplasma? È vero che movimenti de genere si ritengono possibili. È anche vero che sono stati osservati s materiale vivente dei nucleoli che si deformavano in vario modo emet tendo anche delle specie di pseudopodi in numero vario e di varia gran dezza, muovendosi in direzione del citoplasma (FREDERIC, 1951). Ma s tratta anche in questo caso di immagini che differiscono profondament

a quelle sopra descritte, alle quali non mi sembrano pertanto para-onabili. Si rivedano, poi, ad esempio le Figg. 1 e 13. Qui direi che arrebbe trattarsi senz'altro di masserelle di materiali citoplasmatici, erchè del citoplasma hanno tutto l'aspetto morfologico e la struttura ed ppaiono, inoltre, come avvolte da una membrana che non sembra diffe-ire affatto da quella nucleare (alla quale, rileverò pure, si presenta el tutto simile anche nei preparati osservati in contrasto di fase e al icroscopio polarizzatore). Fra l'altro, come potrebbe qui trattarsi di ventuali nucleoli fusi con il citoplasma se in questi organuli cellulari on è notoriamente riconoscibile una membrana propria? Il microscopio lettronico potrà darmi, spero, una risposta definitiva.

Da quanto sopra rilevato mi sembra quindi lecito, ripeto, concludere he almeno in molti casi i lobi in oggetto altro non siano che ammassi li materiali citoplasmatici, ed in particolar modo di RNP, che si pre-arano a migrare internamente al nucleo, ove acquisiranno poi grada-amente l'aspetto e la struttura dei comuni nucleoli.

A proposito dei nucleoli è inoltre da notare: Nei neuroni dei Gaste-opodi Polmonati, sia centrali che periferici, essi sono presenti in nu-mero assai vario. Talvolta se ne osserva uno soltanto, o pochissimi, per ciascun nucleo. Ma più spesso, e in particolar modo nei pirenofori di volume maggiore (si vedano, ad esempio, a tale proposito, le Figg. 1, 8, 23) sono di gran lunga più numerosi (in alcuni casi fino ad un centi-naio ed oltre). Assai varia è anche la loro grandezza. Già la KUNZE (1921), ad esempio, nelle cellule nervose centrali di *Helix pomatia* ne aveva segnalati da meno di un micron ad una dozzina di micron di diametro; in qualche caso io ne ho osservati alcuni di mole anche note-volmente maggiore (un esempio è quello riprodotto nella Fig. 3). Della loro struttura mi sono già in precedenza occupato; ricordo che nei più piccoli nucleoli appare di norma omogenea, mentre in quelli di maggior volume si presenta più o meno complessa (Fig. 15).

A parte la mole e la struttura, l'elevato numero dei nucleoli pone la questione di dove essi prendano origine. Nelle cellule nervose, sia dei Vertebrati che degli Invertebrati in genere, è ben noto che di regola si riscontra un solo nucleolo per ciascun nucleo, talvolta 2-3, ma non in numero molto superiore. I neuroni dei Gasteropodi Polmonati rap-presentano quindi in tal senso una notevole eccezione. Come dirò meglio fra breve, nel tessuto nervoso di questo gruppo di Molluschi un altro fatto eccezionale è dovuto alla frequente presenza nel nucleo di un fortissimo quantitativo di DNA, indice verosimilmente di un elevato grado di poliploidia delle cellule in oggetto (Figg. 17, 18, 34). Si po-

trebbe supporre che appunto a tale ultima circostanza sia dovuto grande numero dei nucleoli, in base alla concezione classica secondo quale questi si formerebbero nelle cosiddette zone nucleolo-formatrici determinati cromosomi. Debbo tuttavia rilevare che negli stessi anima da me presi in esame, come già ebbi occasione di mettere in evidenza i un precedente lavoro (QUATTRINI 1956), oltre a quelle nervose vi sono alt cellule (ad esempio quelle che costituiscono la ghiandola del piede, ghiandole del mantello e le salivari) anch'esse poliploidi e nelle quali n si riscontra affatto un numero notevole di nucleoli. I quadri sopra ill strati suggeriscono dunque la possibilità che l'alto numero di nucle sia dovuto al fatto che essi hanno qui in gran parte origine citopl smatica.

E poiché non è forse pensabile che tutti i nucleoli si formino q a partire dal citoplasma, si deve in questo caso ammettere che possa coesisterne di due differenti origini: una citoplasmatica e l'altra, co suetudinaria, da particolari zone di determinati cromosomi. È prob bile che siano di origine citoplasmatica i nucleoli di maggiori dime sioni, ma è difficile dire se questa possa essere considerata una norm costante. E d'altra parte pare che in molti casi dal citoplasma stes possano anche formarsene altri di dimensioni più o meno modeste (Fi 4). Non è quindi possibile individuarne sempre con certezza il luogo formazione in base alla diversa mole; e neppure lo sembra basando su divergenze nella composizione chimica, nell'aspetto morfologico, nel affinità tintoriali o in qualche altro dettaglio della loro minuta stru tura.

Di un fenomeno assai diverso sembrerebbe trattarsi in quei casi i cui il citoplasma appare più o meno estesamente inciso e trabecola (Figg. 22, 23, 26, 27, 36, 37). Pur presentandosi sulla superficie interna, limite con il nucleo, questi quadri ricordano un poco le ben note fenestr ture che spesso si riscontrano, sia negli Invertebrati che nei Vertebrat sulla superficie periferica dei più grossi neuroni e che vengono interpr tate come un meccanismo atto ad ampliarne la superficie stessa per pe mettere maggiori possibilità di scambio con l'ambiente circostante. potrebbe anche qui pensare ad un dispositivo simile, allo scopo di a mentare la superficie di contatto fra il citoplasma e il grosso nucle per analoghe esigenze metaboliche. E ciò parrebbe anche trovare u certa conferma nella circostanza che detti quadri si riscontrano più frequente nelle cellule nervose di maggiori dimensioni. Sta di fatt però, che talvolta delle trabecole del tutto simili si vedono intern

nente al nucleo, senza alcun rapporto diretto con il citoplasma, dal quale è probabile che esse abbiano preso origine e si siano in un secondo momento separate. Non mi sembra quindi da escludersi che possa trattarsi anche in questi casi di un fenomeno analogo a quello delle lobature prima prese in esame: E cioè di un passaggio di materiali dal citoplasma al nucleo, sia pure sotto altra forma e ad un più minuto livello microscopico. Ricordo che questi materiali mostrano un alto contenuto in RNA, di frequente assai maggiore di quello che si osserva nelle altre regioni del citoplasma. Parrebbe che almeno in parte essi diffondano poi nel territorio nucleare. Deduco ciò dal fatto che nelle singole cellule si osservano abbastanza spesso quantità varie di RNA uniformemente diffuse in tutto il nucleo, oltre quelle normalmente contenute nei nucleoli. Tale reperto appare in particolar modo evidente nel materiale allestito con la tecnica di Brachet per gli acidi nucleici. Qui alcuni dei nuclei, in luogo di assumere una tinta verde come di norma si verifica, prendono una colorazione rosea più o meno intensa, la quale scompare in seguito a trattamento con la ribonucleasi. Il colore è dovuto senza dubbio alla pironina e dipende verosimilmente da quantità varie di RNA, presente nei nuclei stessi allo stato diffuso. Ma una parte delle trabecole citoplasmatiche in oggetto potrebbero anche condensarsi nel nucleo in masserelle di mole maggiore e di forma più definita, non dissimili dai nucleoli. Ciò sembrerebbe in particolar modo attestato da alcuni dei quadri che si riscontrano nei Vaginulidi. Nei neuroni di questi animali ricordo infatti che talvolta un inizio di tale condensazione sembra già verificarsi quando le trabecole appaiono ancora unite al citoplasma. E noterò anche che detta condensazione pare che avvenga qui sempre in forma di numerose, minute sferule, le quali ricordano per lo aspetto morfologico e la struttura i comuni nucleoli e che anch'essi sono non di rado presenti in numero elevatissimo e mostrano costantemente delle dimensioni assai modeste (Figg. 24, 27, 37).

Restano da considerare quei casi in cui il citoplasma che protrude internamente al nucleo appare per lo più in blocchi informi e di assai cospicue dimensioni (Figg. 2, 25, 28, 30, 35, 39, 40). Qui in particolar modo si potrebbe supporre che non si tratti altro che di aspetti diversi di un complicato polimorfismo nucleare. È ben noto che nuclei polimorfi sono stati osservati in numerosi neuroni di diversi gruppi di animali, e in particolar modo nei pesci. Ricorderò a tale proposito le vecchie ricerche di Holmgren (1899) nei gangli spinali di *Lophius piscatorius* e le più recenti di Takahasci (1922) e di Speidel (1919, 1922) nel midollo spinale e

nell'encefalo di varie specie di Teleostei, di SAGUKI (1930) in cellule mo trici spinali e in alcuni neuroni del Purkinje di topi e di ratti, di SCHAB RER (1932, 1934, 1936) e di FLORENTIN (1934) nel nucleo paraipofisario de luccio e della tinca e di MAZZI (1941) in vari centri nervosi diencefalic dell'anguilla. Quest'ultimo A. nel nucleo paraipofisario dell'anguill osservò addirittura che le cellule con nucleo polimorfo sono assai pi numerose di quelle che presentano nuclei di aspetto morfologico nor male. Anche nel caso particolare dei Gasteropodi nuclei più o meno poli morfi furono in passato più volte segnalati da diversi degli AA. che s occuparono della citologia del tessuto nervoso di questi animali, a esempio da MAC CLURE (1898), BOCHENEK (1901), DE NABIAS (1899) e dall KUNZE (1921). Io stesso ne ho riscontrati un po' ovunque in tutto i sistema nervoso centrale, specialmente dei Limacidi, e in precedent lavori (QUATTRINI 1959c; QUATTRINI e BANI 1959) ne descrissi anche alcun dagli aspetti più singolari.

E può darsi benissimo che pure alcuni dei quadri da me qui illu strati abbiano un tale significato. Ma altre volte una simile interpreta zione non credo che sia in alcun modo sostenibile. Mi riferisco in par ticolare a quei casi in cui i grossi blocchi di materiali citoplasmatici s vedono fratturarsi in ammassi di dimensioni più piccole, alcuni dei qual non mostrano più una diretta connessione con il citoplasma. (Si rivedan in particolare, a tale proposito, le Figg. 25, 29 e 40). Anche questi quadr sembrerebbero quindi attestare un passaggio di materiali citoplasmatic all'interno del nucleo. Rispetto ai casi in precedenza presi in esame tale passaggio è evidente che si verifica qui in maniera assai più vistosa

E che cosa avviene di tali blocchi di citoplasma, una volta perve nuti nel territorio nucleare? Talvolta sembra che attorno ad essi si form una specie di grande vacuolo nel quale parrebbe che gradatamente s dissolvano, come se venissero riassorbiti. Un fenomeno simile si osserva nella Fig. 35, ove inoltre è ancora visibile la connessione con il cito plasma stesso. Si tratta, però, di reperti assai rari.

Nella maggior parte dei casi da me osservati i singoli blocchi s scindono, come ho sopra accennato, in frammenti di volume sempre più piccolo, fino a non differire per la mole dai comuni nucleoli, dai quali si distinguono però abbastanza spesso, almeno in un primo momento per avere forme molto più irregolari (Figg. 2, 25, 28, 29, 39, 40).

In altri casi, infine, si ha la sensazione che essi seguano, diciamo così, un doppio destino; e cioè che una parte dei materiali citoplasma tici diffonda nel territorio nucleare e una parte si condensi in masse

elle che divengono identiche ai nucleoli, per l'aspetto morfologico e la ruttura (Fig. 38).

Si pone a questo punto la domanda: perché si verificherebbe qui n passaggio a livello microscopico di materiali dal citoplasma al nucleo, mentre in altri casi non si è mai osservato nulla di simile e neppure si ritiene che possa trattarsi di un fenomeno possibile? In altri ermini: Che cosa presentano di particolare le cellule in oggetto per endere in qualche modo ragione di un reperto simile? Un dato di fatto he forse vale la pena ricordare è che nelle cellule nervose dei Gasteopodi Polmonati e Pseudopolmonati è presente un'abbondante quantità i DNA. Per lo più i singoli nuclei ne sono letteralmente stipati. (Figg. 7, 18, 34). Si tratta di un fenomeno assolutamente costante e quasi eneralizzabile a tutti i neuroni centrali (e che si riscontra, inoltre, non di rado anche nei periferici). Ne fanno eccezione soltanto quelli del rocerebro, peraltro di mole sempre modestissima. In particolar modo ei neuroni di grande e grandissimo volume in contenuto in DNA è eleatissimo ed essi hanno l'aspetto di elementi cellulari altamente poliploidi (si osservi, ad esempio, la Fig. 34).

Una circostanza simile ebbi più volte occasione di rilevarla anche in precedenti lavori (QUATTRINI 1950, 1952) e non mi resulta che si verifichi uel tessuto nervoso di nessun altro gruppo di animali. È con tale circostanza che deve venire messo in rapporto quel passaggio di materiali dal citoplasma al nucleo sopra prospettato? Non saprei dare a tale domanda una precisa risposta. Certo è che una eventualità simile parrebbe trovare qualche conferma in questi ulteriori reperti: 1° - I quadri in precedenza illustrati non si riscontrano mai durante lo sviluppo embrionale, e neppure nel corso dei più precoci stadi dell'accrescimento somatico, quando le cellule nervose, anche se talvolta di volume relativamente notevole, mostrano un contenuto assai scarso in DNA e non si sono ancora in esse instaurati fenomeni di poliploidizzazione (Fig. 32). Più precisamente, negli embrioni di *Limax maximus* e di *Helix aspersa* li ho osservati per la prima volta al momento della schiusa dalle uova, e sempre in cellule che già mostravano un forte quantitativo di DNA e che già presumibilmente avevano un notevole grado di poliploidia. 2° - Essi sono sempre in particolar modo evidenti nelle cellule di dimensioni maggiori, nelle quali di gran lunga maggiore è anche il contenuto in DNA. 3° - Ed ancor più accentuati appaiono abbastanza spesso in un gruppo di neuroni secernenti nei quali il DNA, a parità di volume nucleare, sembra presente non di rado in quantità maggiore di quello che si riscontra nelle

altre cellule nervose. 4° - E sempre a tale proposito, ricorderò infine il fatto che nessun quadro del genere si osserva nei Prosobranchi, ove il tessuto nervoso è formato ovunque da elementi cellulari di dimensioni assai modeste e normalmente diploidi (Fig. 31).

In detto ordine di idee, i materiali citoplasmatici pervenuti nel territorio nucleare dovrebbero in qualche modo servire alla sintesi del DN. E poiché questi materiali, come ho più volte rilevato e come mostrano le loro marcate affinità tintoriali per la pironina, hanno di norma un altissimo contenuto in RNA, si potrebbe supporre che appunto quest'ultimo giuochi un ruolo di fondamentale importanza in tale processo. L'ipotesi che il DNA possa venire sintetizzato a spese del RNA fu già emessa da BRACHET. È noto che essa sembrò trovare conferma, in particolar modo nelle uova di riccio di mare, da ulteriori ricerche dello stesso e di altri AA. Ma è anche ben noto che venne in seguito ripetutamente criticata, e forse oggi non si ritiene dai più tenibile. Si tratta però di un problema ancora aperto, e in complesso non mi sembra che, nel tentativo di dare una plausibile interpretazione dei quadri da me qui illustrati, debba essere del tutto ripudiata una simile ipotesi.

BIBLIOGRAFIA

BOCHENEK A., 1901. — *Contribution à l'étude du système nerveux des Gastéropodes (Hel pomatia).* Névraxe, **3**. *Citato in:* LEGENDRE 1908-1909.

BOLOGNARI A., 1949. — *Recenti vedute sulla struttura, sulla ultrastruttura, sullo stato sico-chimico e sulle attività funzionali del nucleolo.* Arch. Zool. Ital., **44**: 53-139.

DE NABIAS B., 1899. — *Noyau lobé des cellules nerveuses chez les Gastéropodes pulmon aquatiques (Lymnaea stagnalis et Planorbis corneus). Action des anesthésiques g néraux (chloroforme).* Trav. Lab. Arcachon, **8**: 36-38.

FLORENTIN P., 1935. — *Les diverses voies d'excrétion des produits hypophysaires ch les Téléostéen.* Rev. Franç. Endocr., **112**: 271-286.

FREDERIC J., 1951. — *Rapports de la membrane nucléaire avec les nucléoles et le cho driome. Étude sur le vivant et en contrast di phase.* C. R. Soc. Biol., **145**: 1913-191

GABE M., 1949. — *Sur la présence de cellules neuro-sécrétrices chez Dentalium ental* C. R. Acad. Sciences, **229**: 1268-1270.

—, 1951. — *Données histologiques sur la neuro-sécrétion chez les Pterotrachcidae (Hét ropodes).* Rev. canad. Biologie, **10**: 391-410.

—, 1953. — *Particularités histologiques des cellules neuro-sécrétrices chez quelques Pr sobranches Monotocardes.* C. R. Acad. Sciences, **236**: 333-335.

—, 1954. — *La neuro-sécrétion chez les Invertébrés.* L'Année Biologique, **30**: 5-62.

ABE M., 1955. — *Particularités histologiques des cellules neuro-sécrétrices chez quelques Lamellibranches.* C. R. Acad. Sciences, **240**: 1810-1812.

OLMGREN E., 1899. — *Zur Kenntnis der Spinalganglienzellen von Lophius piscatorius L.* Anat. Hefte, **12**. *Citato in:* MAZZI 1941.

UNZE H., 1921. — *Zur Topographie und Histologie des Centralnervensystems von Helix pomatia L.* Zeitsch. fur wiss. Zool., **118**: 25-203.

EGENDRE R., 1908-1909. — *Contribution à la connaissance de la cellule nerveuse. La cellule nerveuse d'Helix pomatia.* Arch. d'Anat. microsc., **10**: 287-554.

EMCHE H., 1955. — *Neurosecretion and incretory glands in a tectibranch mollusc.* Experientia, **11**: 320-326.

AC CLURE CH. F. W., 1898. — *The finer structure of the nerve-cells of Invertebrates. I. Gastropoda.* Zool. Jahrb. Abth. Anat., **11**. *Citato in:* KUNZE 1921.

AZZI V., 1941. — *Caratteri strutturali e funzionali dei nuclei preottici nei Teleostei (Anguilla vulgaris Cuv.).* Arch. Ital. di Anat. ed Embr., **44**: 1-76.

UATTRINI D., 1950. — *Particolarità strutturali del nucleo nelle cellule nervose dei gangli cerebrali di Helix vermiculata Müller.* Rend. Acad. Naz. Lincei, serie VIII, **8**: 149-152.

—, 1952. — *Osservazioni sulla struttura del nucleo nelle cellule nervose del sistema nervoso centrale di Helix vermiculata Müller durante l'accrescimento somatico.* Boll. di Zool., **19**: 319-325.

—, 1956. — *Osservazioni sulla struttura del nucleo in alcuni tessuti ed organi di Papillifera bidens L.* Mon. Zool. Ital., **4**: 1-17.

—, 1958. — *Una struttura nervosa sinciziale e asimmetrica nei gangli parietali di alcuni Gasteropodi Polmonati.* Mon. Zool. Ital., **64**: 1-26.

—, 1959*a*. — *Osservazioni sui nucleoli nelle cellule nervose dei Molluschi Gasteropodi.* Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., **35**: 1341-1344.

—, 1959*b*. — *Passaggio di ribonucleoproteine dal citoplasma al nucleo nei neuroni centrali dei Gasteropodi Polmonati e Pseudopolmonati.* Boll. di Zool., (*in corso di stampa*).

—, 1959*c*. — *Particolare morfologia del nucleo nei neuroni centrali dei Gasteropodi Polmonati.* Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., **35**: 1339-1341.

UATTRINI D. e BANI G., 1959. — *Particolarità strutturali nel tessuto nervoso dei Molluschi Gasteropodi.* Mon. Zool. Ital., **67**: 94-105.

AGUKI, 1930. — *Citato in:* SCHARRER 1932.

SCHARRER B., 1935. — *Ueber das Hanström'sche Organ X bei Opisthobranchiern.* Pubbl. Staz. Zool. Napoli, **15**: 132-142.

—, 1937. — *Ueber sekretorisch tätige Nervenzellen bei wirbellosen Tieren.* Naturwiss., **25**: 131-138.

—, 1945. — *Neurosecretion.* Physiol. Rev., **25**: 171-181.

Scharrer B., 1953. — *Comparative physiology of invertebrate endocrines.* Ann. Rev. P[hy]siol., **15**: 547-572.

—, 1955. — *Hormones in invertebrates.* In: *The Hormones.* Ed. Pincus, G. & Thimann K. V., **3**: 57-95. Academic Press, New York.

Scharrer E., 1932. — *Die Sekretproduction im Zwischenhirn einiger Fische. (Untersuchungen über das Zwischenhirn der Fische III).* Zeit. vergl. Physiol., **17**: 491-509.

—, 1934. — *Ueber die Beteiligung des Zellenkerns an sekretorische Vorgänge in Nervenzellen.* Frankf. Zeit. Path., **47**: 143-151.

—, 1936. — *Vergleichende Untersuchungen über die zentralen Anteile des vegetativen Systems.* Zeit. Anat. und Entwick., **106**: 169-192.

Scharrer E. und Scharrer B., 1954. — *Neurosekretion.* In: *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen.* Ed. Bargmann. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer, **6**: 953-1066.

Speidel C., 1919. — *Gland cells of internal secretion in the spinal cord of skates.* Carnegie Inst. of Wash., **281**: 1-13.

—, 1922. — *Further comparative studies in other fishes of cells that are homologous with the large irregular glandular cells in the spinal cord of the skates.* J. Comp. Neur., **34**: 303-317.

Takahasci N., 1922. — *Ueber Kerneveränderungen in Ganglienzellen der Fische.* Arch. für Zellforsch., **16**: 463-472.

Welsh J. H., 1956. — *Neurohormones of Invertebrates. I. Cardioregulators of Cypridina and Buccinum.* J. marine Biol. Ass. U. K., **35**: 193-261.

SPIEGAZIONE DELLE TAVOLE LV-LX

Tutte le figure riprodotte nelle Tavole sono microfotografie di cellule nervose dei gangli ventrali.

Tavola LV

Fig. 1. — *Limax cinereo-niger.* Uno dei più grossi neuroni centrali (Bouin, Pappenheim-Unna; 295 ×). In alto a destra si osserva un lobo di citoplasma che parrebbe in procinto di distaccarsi nel nucleo.

Fig. 2. — *Milax gagates* (Bouin, Pappenheim-Unna; 295 ×). Nella cellula più grande blocchi di materiali citoplasmatici si spingono nel territorio nucleare.

Fig. 3. — *Milax gagates* (Bouin, Pappenheim-Unna; 295 ×). Nel nucleolo di dimensioni maggiori si osservano evidenti tracce di un peduncolo, probabile indizio della sua originaria connessione con il citoplasma.

Fig. 4. — *Limax cinereo-niger* (Bouin, Pappenheim-Unna; 425 ×). Si notino i numerosi

lobi citoplasmatici, al limite con la regione nucleare. Il più grande lobo a destra appare in procinto di distaccarsi dal citoplasma; da un lobo simile è con ogni probabilità derivato il grosso nucleolo presente nel nucleo.

Fig. 5. — *Milax gagates* (Bouin, Pappenheim-Unna; 295 ×). Si noti il lungo peduncolo del più grande nucleolo.

Fig. 6. — *Milax gagates* (Bouin, Pappenheim-Unna; 325 ×). Nella cellula al centro della figura è ben visibile un altro grosso nucleolo peduncolizzato.

Fig. 7. — *Milax gagates*. Particolare della Fig. 9, a più forte ingrandimento (350 ×). Si osservino i numerosi lobi di citoplasma nella regione prospiciente il nucleo.

Fig. 8. — *Limax flavus* (Bouin, Pappenheim-Unna; 430 ×). A destra si vede un lobo citoplasmatico verosimilmente in atto di passare nel nucleo.

Tavola LVI

Fig. 9. — *Milax gagates* (Gendre, Pappenheim-Unna; 210 ×). Si notino le lobature del citoplasma, al limite con il nucleo. Le cellule riprodotte nella figura appartengono ad un gruppo di neuroni secernenti. Nel prolungamento della grande cellula a destra sono visibili alcune gocce di neurosecreto ed altre si intravedono fra i neuriti in basso verso sinistra (due di queste sono indicate dalle frecce).

Fig. 10. — *Milax gagates* (Bouin, Pappenheim-Unna; 420 ×). Un grosso lobo citoplasmatico che sembra si prepari a migrare nel nucleo. Si noti la sua colorazione nettamente più intensa di quella del resto del citoplasma stesso, indice di un più alto contenuto in RNA. In basso è presente anche un lobo molto più piccolo.

Fig. 11. — *Milax gagates* (Carnoy, Pappenheim-Unna; 420 ×). Si osservi il lobo citoplasmatico ancora unito da un grosso peduncolo al citoplasma stesso e già strutturato come un tipico nucleolo.

Fig. 12. — *Limax flavus* (Carnoy, Pappenheim-Unna; 620 ×). Due altri lobi di materiali citoplasmatici, i quali presentano la struttura di molti dei comuni nucleoli. Il lobo a destra appare come reciso verso la base ed è con ogni probabilità prossimo a distaccarsi nel nucleo.

Fig. 13. — *Limax cinereo-niger*. Particolare ingrandito della Fig. 1 (420 ×). Si noti il lobo di citoplasma in basso a sinistra.

Fig. 14. — *Cochlodina laminata* (Bouin, Pappenheim-Unna; 700 ×). Citoplasma lobato in una cellula nervosa di dimensioni relativamente modeste.

Fig. 15. — Particolare della Fig. 8, a più forte ingrandimento (700 ×). Il lobo citoplasmatico visibile a destra presenta una struttura del tutto paragonabile a quella che si osserva nei nucleoli.

Fig. 16. — Citoplasma lobato in una cellula nervosa di *Rumina decollata* (Carnoy, Pappenheim-Unna; 540 ×).

Tavola LVII

Fig. 17. — *Milax gagates* (Hollande, Feulgen; 160 ×). Un gruppo di neuroni secernenti. Si noti fra l'altro che i nuclei contengono un notevole quantitativo di DNA e che tutti i prolungamenti cellulari convergono in un medesimo fascio, nel quale intravedono numerosissime gocce di neurosecreto.

Fig. 18. — *Papillifera bidens* (Bouin, Feulgen; 500 ×). Il gruppo di pirenofori a limiti indistinti, presente nei Clausilidi. Si osservi anche qui l'alto contenuto nucleare in DNA.

Fig. 19. — *Milax gagates* (Hollande, paS; 210 ×). Lo stesso gruppo di neuroni delle Figg. 17 e 18 colorati con il metodo di Hotchkiss. Nel fascio di neuriti le gocce di neurosecreto sono appena percettibili.

Fig. 20. — *Milax gagates* (Hollande, Rasmussen-Ignesti; 210 ×). Lo stesso gruppo di neuroni della figura precedente. Si notino in particolare le gocce e i granuli di secreto, colorati dalla fucsina acida, nel fascio di neuriti indicato dalle frecce.

Fig. 21. — *Milax gagates* (Bouin, Rasmussen-Ignesti; 420 ×). Gocce e granuli di neurosecreto, convogliati lungo i neuriti del gruppo di cellule nervose riprodotte nelle Figg. 9, 17, 19 e 20.

Fig. 22. — *Eobania vermiculata* (Bouin, Pappenheim-Unna; 420 ×). Si notino le incisure del citoplasma nella regione prospiciente il nucleo.

Tavola LVIII

Fig. 23. — *Helix aspersa* (Bouin, Pappenheim-Unna; 410 ×). A destra è visibile una trabecola di citoplasma che si spinge nel nucleo. In alto si osserva quasi una soluzione di continuità nella membrana nucleare.

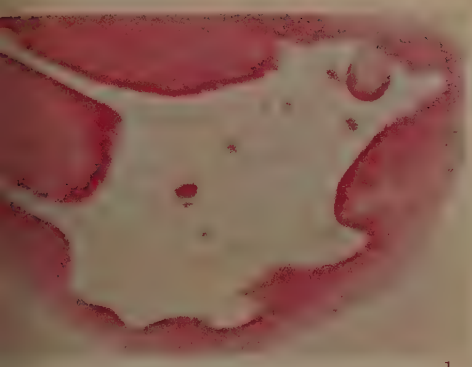
Fig. 24. — *Vaginulus borellianus* (Bouin, Pappenheim-Unna; 3000 ×). Caratteristiche incisure del citoplasma al limite con il nucleo, in uno dei più voluminosi neuroni centrali dei Vaginulidi. Si noti anche l'elevatissimo numero dei nucleoli e le loro dimensioni molto piccole e pressochè uniformi.

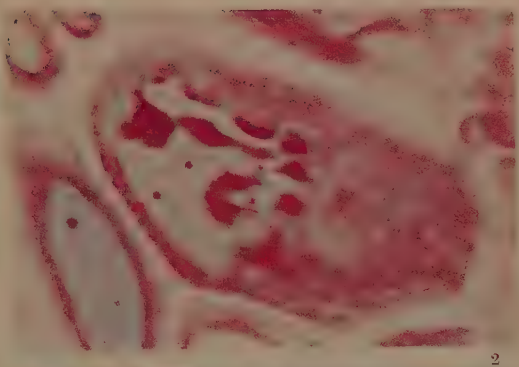
Fig. 25. — *Milax gagates* (Bouin, Pappenheim-Unna; 540 ×). Numerosi blocchi di materiali citoplasmatici protrudono nel nucleo.

Fig. 26. — Citoplasma inciso e frastagliato al limite con il nucleo, in una cellula gigante di *Limax cinereo-niger* (Bouin, Pappenheim-Unna; 300 ×).

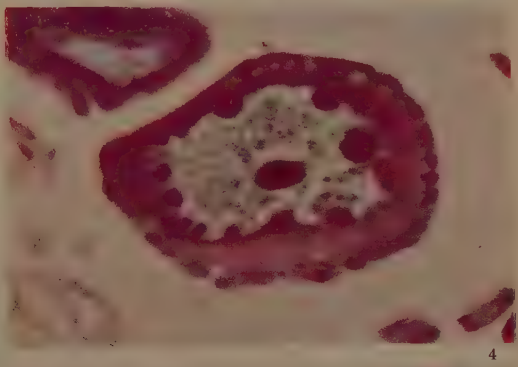
Fig. 27. — *Vaginulus borellianus* (Bouin, Nissl; 450 ×). Frange di materiali citoplasmatici nella zona prospiciente il nucleo. Si noti anche la loro colorazione assai più intensa di quella del resto del citoplasma stesso.

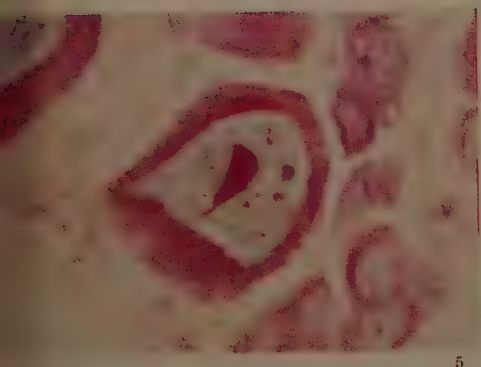
Fig. 28. — *Milax gagates* (Bouin, Pappenheim-Unna; 540 ×). Informi blocchi di citoplasma nel territorio nucleare.


1


2

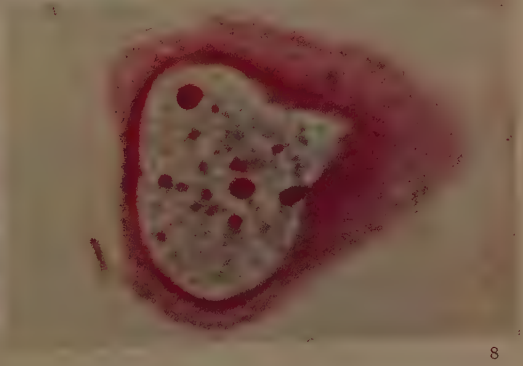
3


4

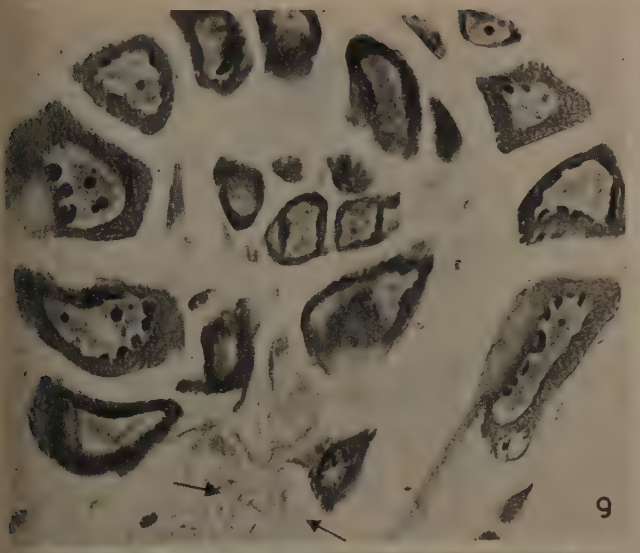

5

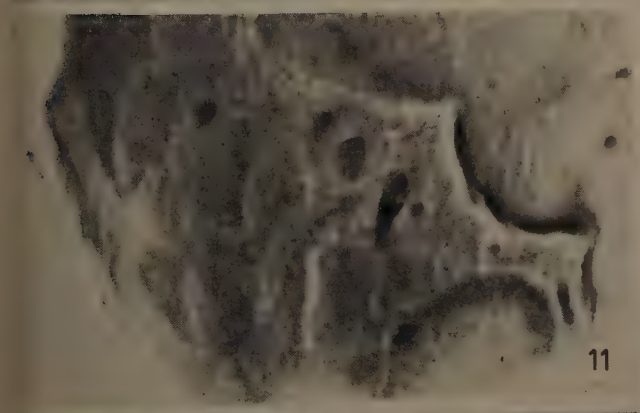
6

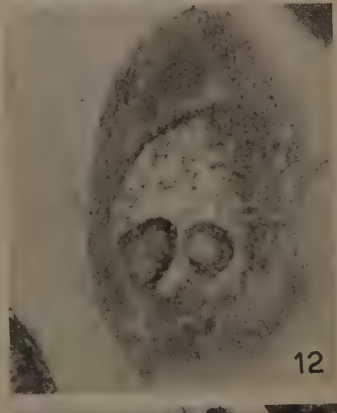
7

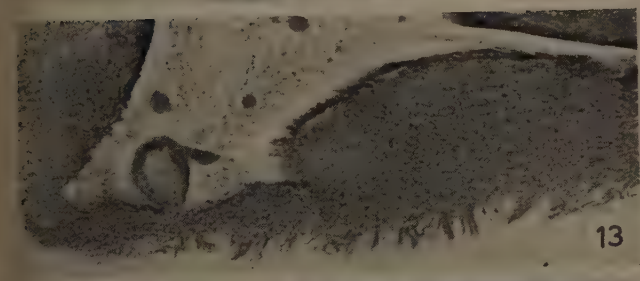

8

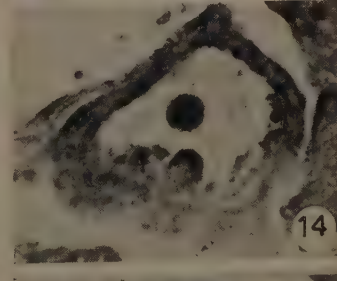
D. Quattrini — Osservazioni su un passaggio di ribonucleoproteine dal citoplasma al nucleo e su un gruppo di neuroni secernenti nel sistema nervoso centrale dei Molluschi Gasteropodi.

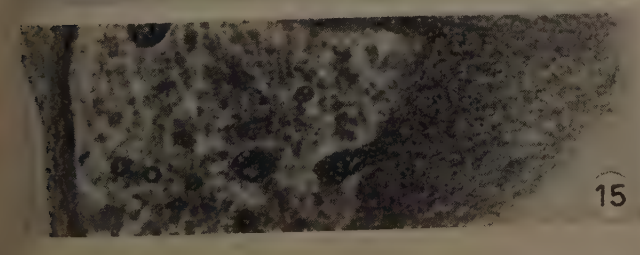




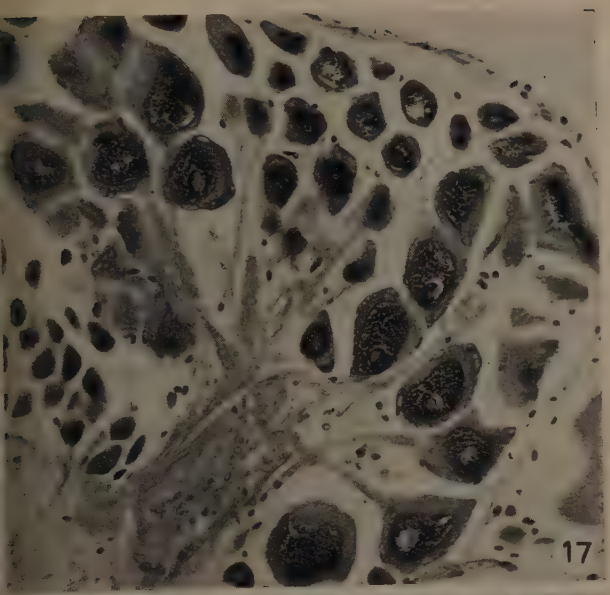


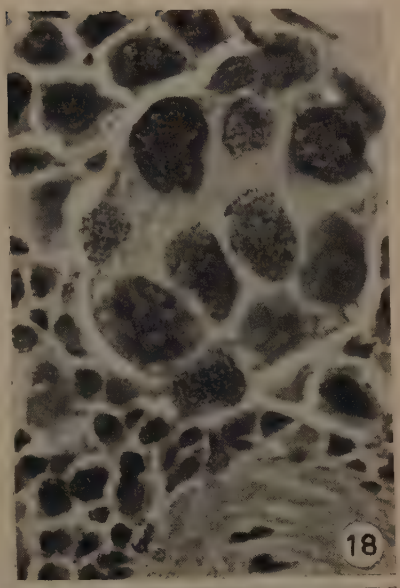


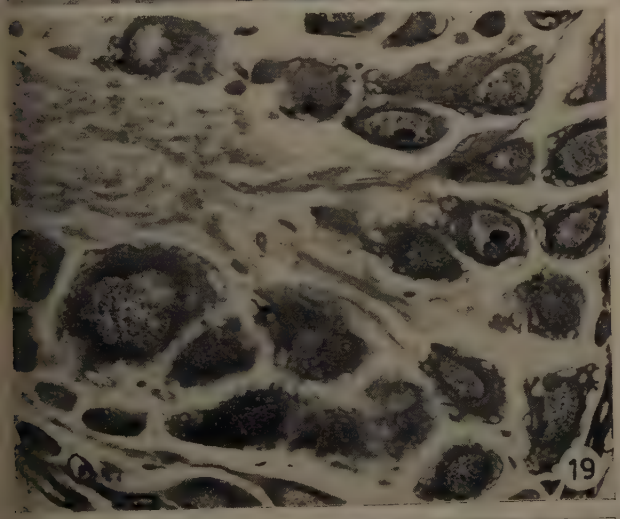


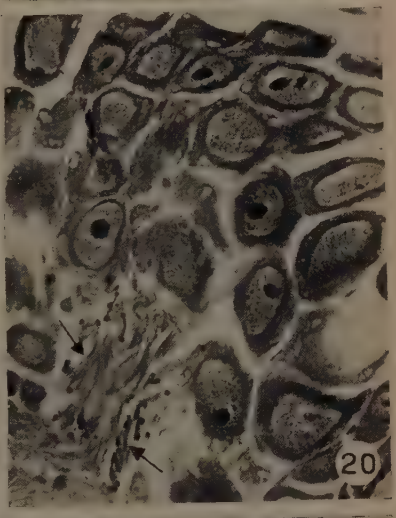


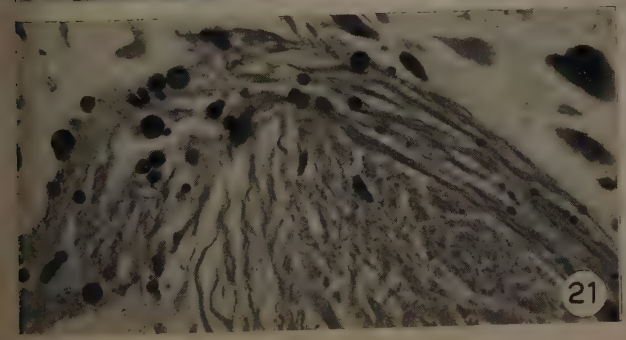
D. Quattrini — Osservazioni su un passaggio di ribonucleoproteine dal citoplasma al nucleo e su un gruppo di neuroni secernenti nel sistema nervoso centrale dei Molluschi Gasteropodi.

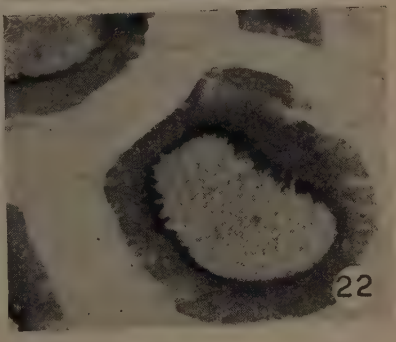




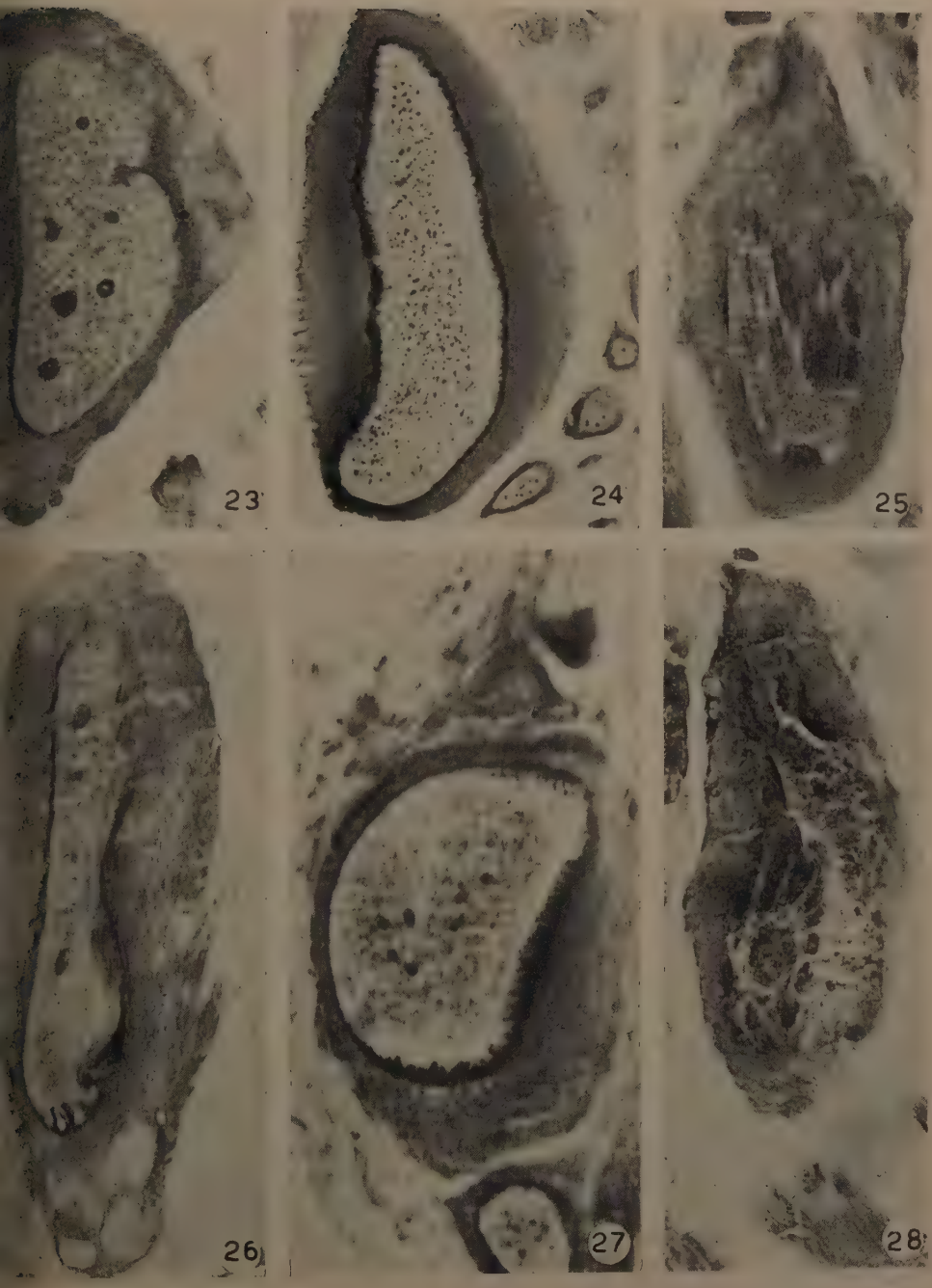




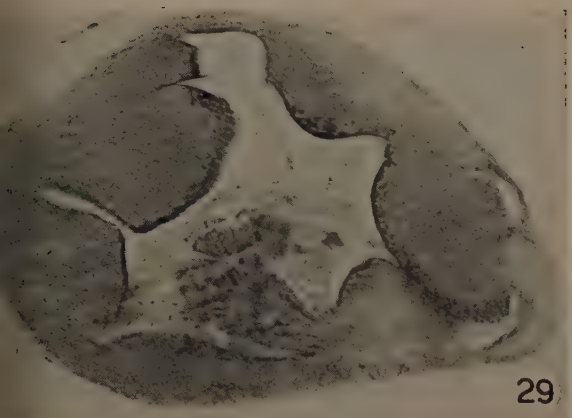


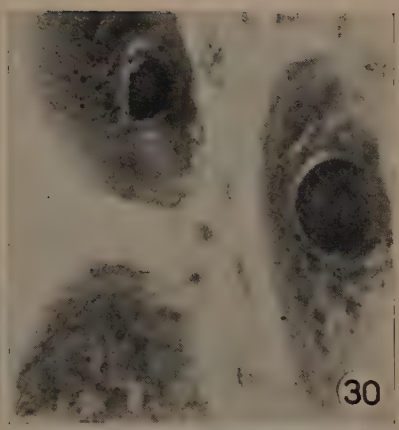


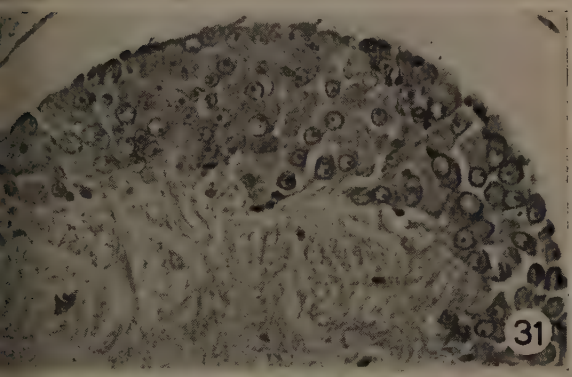
D. QUATTRINI — Osservazioni su un passaggio di ribonucleoproteine dal citoplasma al nucleo e su un gruppo di neuroni secernenti nel sistema nervoso centrale dei Molluschi Gasteropodi.

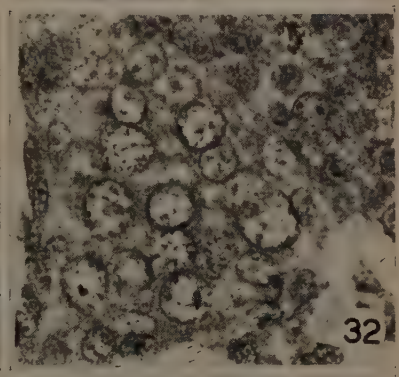


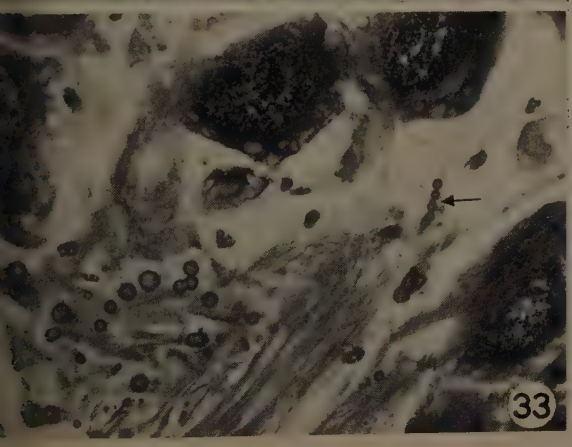
O. QUATTRINI — Osservazioni su un passaggio di ribonucleoproteine dal citoplasma al nucleo e su un gruppo di neuroni secernenti nel sistema nervoso centrale dei Molluschi Gasteropodi.

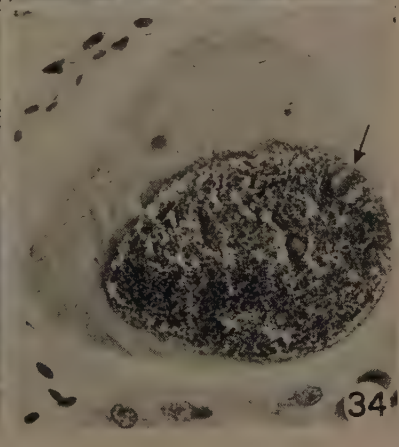




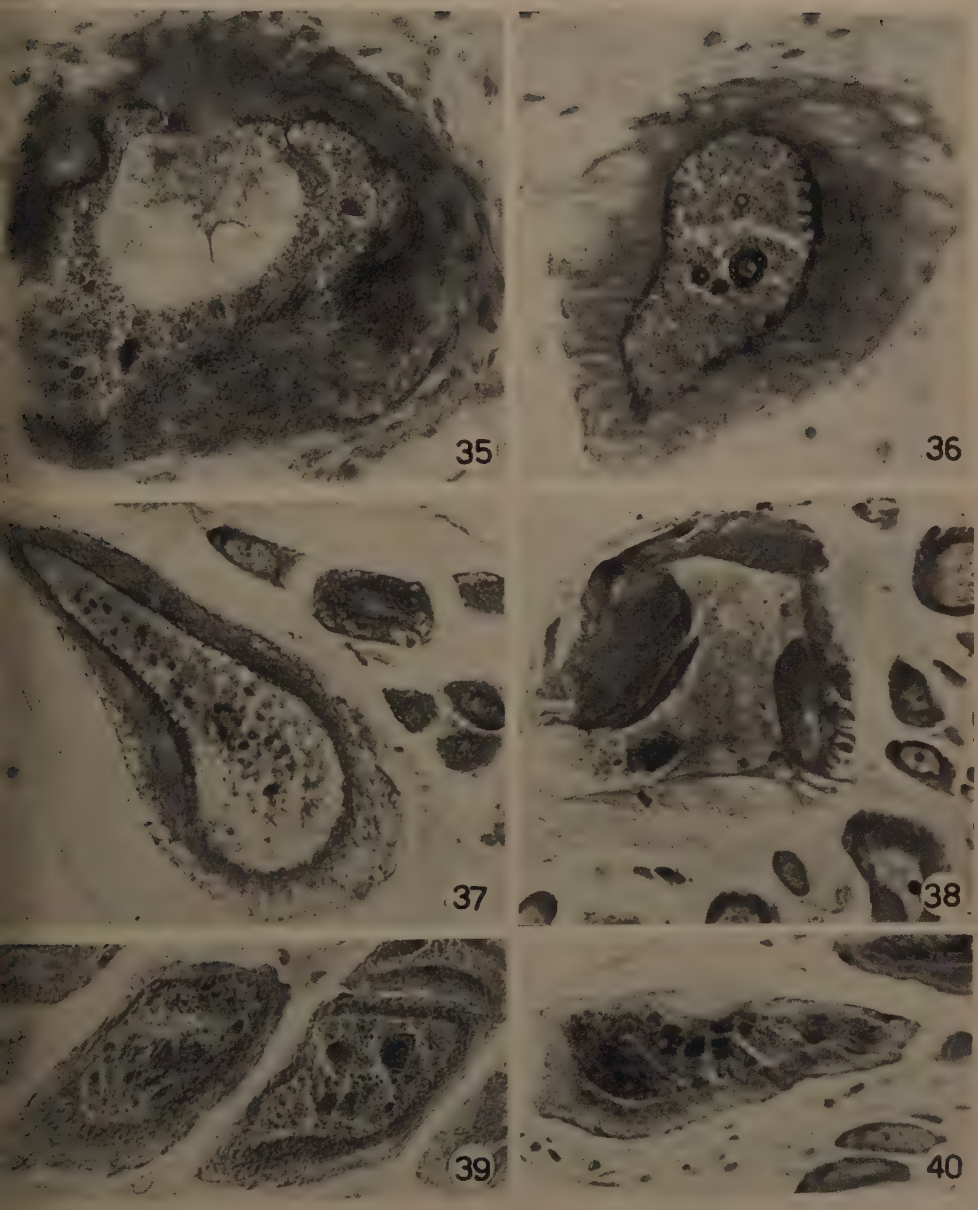








O. QUATTRINI — Osservazioni su un passaggio di ribonucleoproteine dal citoplasma al nucleo e su un gruppo di neuroni secernenti nel sistema nervoso centrale dei Molluschi Gasteropodi.



D. QUATTRINI — Osservazioni su un passaggio di ribonucleoproteine dal citoplasma al nucleo e su un gruppo di neuroni secernenti nel sistema nervoso centrale dei Molluschi Gasteropodi.

Tavola LIX

29. — *Limax cinereo-niger* (Bouin, Pappenheim-Unna; 295 ×). Un neurone di mole gigante e con evidente polimorfismo nucleare. In basso una grossa travata di citoplasma protrude nel nucleo, ove sembra frammentarsi in masse di dimensioni minori.

30. — *Milax gagates* (Bouin, Pappenheim-Unna; 460 ×). Grossi blocchi tondeggianti di citoplasma aggettano nella regione nucleare. L'intensa colorazione con la pironina è dovuta al loro alto contenuto in RNA.

31. — *Cyclostoma elegans* (Bouin, Emallume-eosina; 250 ×). Sezione di un ganglio della massa nervosa ventrale. Si notino specialmente le dimensioni assai modeste e pressochè uniformi dei pirenofori.

32. — *Helix aspersa* (Bouin, Feulgen; 430 ×). Sezione attraverso un ganglio nervoso in un embrione sacrificato 7 giorni dopo la deposizione delle uova. Si osservi in particolare che i nuclei contengono una scarsa quantità di DNA.

33. — *Milax gagates* (Hollande, Gomori; 350 ×). Lo stesso gruppo di neuroni secernenti delle Figg. 9, 17, 19 e 20. Sono ben visibili numerose gocce di neurosecreto, colorate dalla floxina (Quelle che indica la freccia si trovano entro un neurite).

34. — *Limax cinereo-niger* (Bouin, Feulgen; 350 ×). Si noti l'elevatissimo contenuto nucleare in DNA. A destra in alto (contrassegnato dalla freccia) si intravede un piccolo lobo di citoplasma che sembra in procinto di distaccarsi nel nucleo.

Tavola LX

35. — *Limax flavus* (Bouin, Pappenheim-Unna; 360 ×). Un grosso blocco di materiali citoplasmatici (in alto ne è ancora ben visibile la connessione con il citoplasma stesso) sembra che venga riassorbito nel territorio nucleare.

36. — Numerose trabecole di citoplasma aggettano entro il nucleo in un grosso neurone di *Eobania vermiculata* (Bouin, Pappenheim-Unna; 330 ×).

37. — *Laevicaulis alte* (Bouin, Pappenheim-Unna; 360 ×). Si osservino le fini incisure citoplasmatiche presenti in alcune zone al limite con il nucleo. E come nelle Figg. 24 e 27, si noti anche qui che i nucleoli hanno dimensioni sempre assai piccole e pressochè uniformi.

38. — *Milax gagates* (Gendre, Pappenheim-Unna; 360 ×). Nel nucleo della cellula più grande si vede, in basso, un blocco di citoplasma che sembra in parte condensarsi in masserelle di mole più piccola e con l'aspetto e la struttura dei nucleoli.

39. — Frammenti di materiali citoplasmatici nella regione nucleare di due neuroni di *Milax gagates* (Bouin, Pappenheim-Unna; 430 ×).

Fig. 40. — *Milax gagates* (Bouin, Pappenheim-Unna; 340 ×). In alto un grosso bl di citoplasma appare come fratturato internamente al nucleo in ammassi di v me più piccolo, i quali per l'alto contenuto in RNA, l'aspetto morfologico e struttura non differiscono dai comuni nucleoli.

SUMMARY

In the cytoplasm bordering upon the nucleus of several central neurons of monata and Pseudopulmonata (Soleolifera) Gastropods can be found peculiar, hist gical pictures that the A. discusses and interprets as the probable expression of a sage, at a microscopical level, of cytoplasmic materials in the nucleus. This happ chiefly in big and, judging from the very high contents in DNA, polyploid cells. cannot find such a phenomenon either during the embryonic developpement, when cells are little and poor in DNA, or in the Prosobranchia, the nervous cells of wh are constantly small-sized and diploid ones. Moreover the A. notices the presence a ventral ganglion of *Limacidae* and *Helicidae* of an unpaired cluster of secreting rons. He points out that the neurosecretion flows along a bundle of neurites and least in part, is carried outside the central nervous system. Contrary to the rule neurosecretion is both Gomori and paraldehyde-fuchsin negative.

RIASSUNTO

In numerosi neuroni centrali dei Gasteropodi Polmonati e Pseudopolmonati n regione prospiciente il nucleo il citoplasma mostra dei singolari aspetti morfologici l'A. discute ed interpreta come la probabile espressione di un passaggio, a livello mi scopico, di materiali citoplasmatici nel territorio nucleare. Ciò si verifica con partico evidenza in cellule di grandi dimensioni e con un altissimo contenuto nucleare in D indice di un elevato grado di poliploidia. Nulla di simile si osserva durante lo svilu embrionale, quando il volume delle cellule nervose è assai modesto e il DNA è present quantità limitata. E neppure si riscontrano quadri paragonabili nei Prosobranchi, cui il tessuto nervoso è costituito da cellule uniformemente piccole e con nuclei diplo

L'A. descrive inoltre un gruppo di neuroni secernenti, situati asimmetricamente un ganglio della massa nervosa ventrale dei Limacidi e degli Elicidi. Egli rileva l'altro che i prodotti della neurosecrezione si propagano lungo un fascio di neurit almeno in parte, vengono convogliati all'esterno del sistema nervoso centrale. A di renza di quanto di norma si verifica, il neurosecreto non è qui Gomori-positivo e nepp si colora con la fucsina-paraldeide.

ENRICO MESSERI

CONSIDERAZIONI GEOGRAFICHE SULLE FREQUENZE DEI GRUPPI SANGUIGNI *ABO* IN ALCUNE TRIBÙ SOMALE

(con 7 figure nel testo) *

In redazione: il 15 Novembre 1959.

Come è noto la Somalia, nei confini politici attuali, non rappresenta nè una regione geograficamente definita, nè l'area di insediamento di un popolo etnicamente omogeneo. Questa zona dell'Africa Orientale offre pertanto allo studioso un campo quanto mai vasto per ricerche comparative che permettono sempre più e sempre meglio di penetrare addentro al coacervo raziale delle popolazioni indigene allo scopo di delimitarne le fisionomie principali.

Di recente (luglio 1959) una spedizione di studiosi della nostra Università si è recata in quei territori per effettuare dei rilievi botanici, zoologici, venatori e antropologici. La spedizione sovvenzionata dal Consiglio Nazionale delle Ricerche (composta dai Dottori Moggi, Bavazzano, Funaioli, Simonetta, Bruzzone) ha raccolto una ricca messe di reperti sulla vegetazione e la fauna e non ha trascurato, nei limiti delle ristrette possibilità pratiche e delle ingenti difficoltà locali, di raccogliere anche un discreto numero di rilievi antropologici, fra i quali assume un valore speciale il saggio dei *gruppi sanguigni* delle popolazioni indigene trovate lungo l'itinerario della spedizione. I saggi sono stati fatti con il massimo scrupolo e con tecnica corretta data la dotazione completa di cui si era fornita la spedizione presso il Centro Trasfusionale di Firenze.

Prima di entrare nell'argomento dei dati sperimentali desideriamo richiamare l'attenzione del lettore sulle caratteristiche etniche della Somalia, che si presentano assai complesse. Ciò servirà per meglio comprendere quanto andremo affermando nelle conclusioni del presente studio.

* Lavoro eseguito con un contributo del CNR.

Per quanto i somali pensino di discendere da un ceppo arabo, i ca ratteri raziali li accostano molto alle note della razza etiopica. Le g nealogie, spesso anastomizzate fra di loro nelle diverse cabile, sono com plesse. Fra i cinque gruppi etnici tradizionali si notano i *Dir* della So malia settentrionale, i *Darod* della Somalia centrale e meridionale, g *Hauiya* a nord est del medio corso dell'Uebi Scebeli, i *Dighil* e i *Raho nuin,* fra l'Uebi e il Giuba (Puccioni). Ciascun gruppo si suddivide po capillarmente in tribù e famiglie che spesso si trovano stanziate lo tano dalle residenze ufficiali dei gruppi di origine, come accade per i Di che hanno propaggini di tribù fino alla regione di Merca, e per la trib dei Darod che hanno una dispersione di cabile dall'estremo nord de paese, dove risiedono i *Migiurtini,* fino all'Ogaden e all'Alto Giuba. L principali tribù della stirpe Hauiya sono anch'esse sparse e rappresen tate dagli *Abrghedir, Murosada, Hauadle, Digodia,* ecc., gente nomad in cerca di pascoli freschi per i propri armenti.

I popoli saggiati dalla nostra spedizione non sono etnicamente pur pur sapendo che tutte queste popolazioni appartengono ad un gruppo ben definito che discende in gran parte dall'antica razza etiopica, m sono caratterizzati da notevoli infiltrazioni arabe riconoscibili non sol per i tratti somatici ma sopratutto per certe culture e per la lingua. Un visione sintetica delle principali cabile somale è ben riprodotta nell carta etnografica del Biasutti (fig. 1). In Somalia oltre alle genti sud dette esistono gruppi negroidi stanziati lungo il corso medio e inferior dei due fiumi principali del Paese (Uebi e Giuba) quasi tutti di origin bantù e preesistenti all'invasione dei *Galla* e dei *Somali,* tali sono l cabile degli *Scilde, Sciaveli* e i *Dube* che non raggiungono un sesto del l'intero popolo somalo. Il gruppo dei *Bon* che sconfina nel Kenia, attra verso l'elaborazione statistica dei reperti del Puccioni sembra apparte nere ad una forma eterogenea arcaica, ma già impura della razza etio pica come pure le tribù dei cacciatori *Rihi* (Parenti). In generale per è da ritenere che in Somalia i *Negri* siano giunti in un tempo non molt remoto in quanto erano agricoltori sedentari, e furono colà trovati gi stanziati dalle tribù pastorali camitiche nomadi. La diffusione dell razza etiopica risale invece ai tempi preagricoli e prepastorali (Batta glia). Anche i *Bagiuni,* non assimilabili ai Somali, vivono nell'Oltre giuba e nelle vicine isole Dundas, dove esercitano sopratutto la pesca sono considerati incroci di arabi (Parenti 1959), persiani, bantù, etio pici e forse anche indonesiani (Puccioni 1959, Grottanelli 1959). Simil ai Bagiuni sono gli *Hamarani* ristretti ora vicino a Brava.

Dopo questa breve parentesi, crediamo opportuno non soffermarc

sulla tecnica dell'esame dei gruppi sanguigni, e sulle possibilità di indagare sui vari gruppi e sottogruppi del sangue umano, che hanno importanza sopratutto nella diagnostica e nella terapia (CEPPELLINI *et al.*

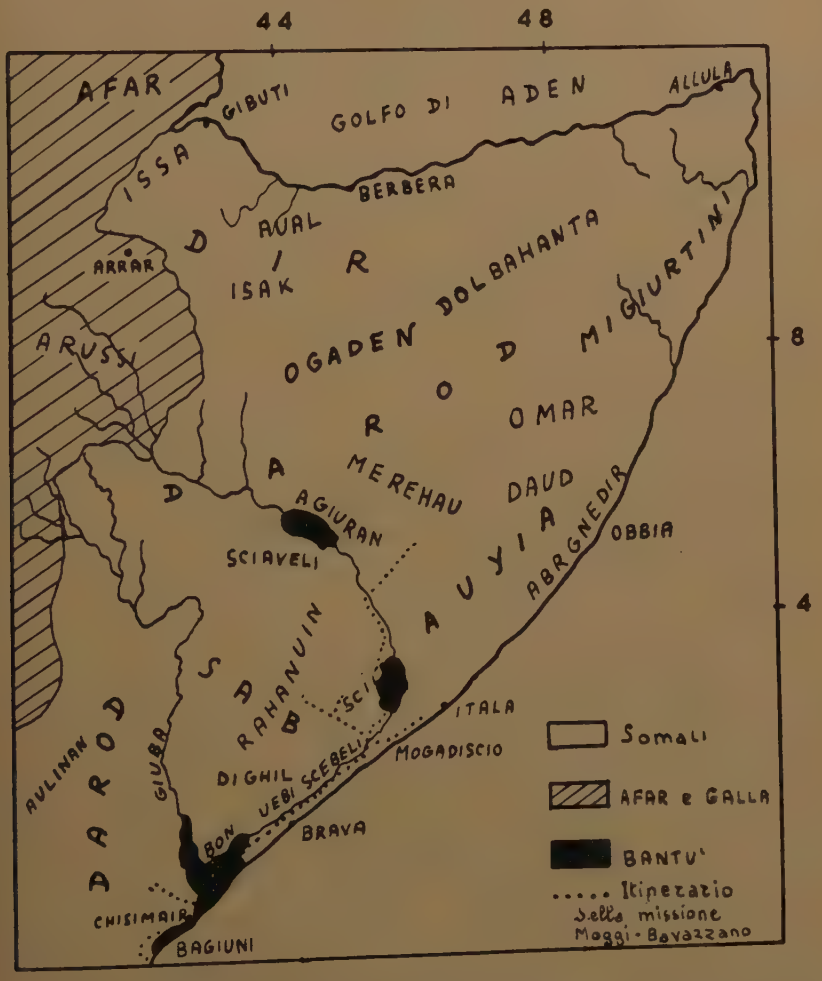


Fig. 1. — Carta geografica delle principali popolazioni della Somalia (da PUCCIONI in BIASUTTI).

1952). Dal punto di vista biologico e genetico noi abbiamo potuto rilevare soltanto il gruppo classico del sistema ABO, non è stato possibile invece per ragioni tecniche, ricercare anche i gruppi Rh e MN.

I gruppi sanguigni, come abbiamo fatto rilevare a proposito del

test PTC (Messeri 1959), rappresentano dei caratteri fortemente discri minanti sul piano organico fra i vari individui anche di una stessa g nealogia, in quanto sono sostenuti da fattori ereditari molto resisten alle influenze ambientali. Si tratta in concreto della trasmissione er ditaria di un carattere dipendente da due fattori, scelti fra quelli di u serie unilocale, vale a dire di poliallelia o di allelomorfismo multipl Quando i geni che influenzano un dato carattere sono più di due, qualità geniche presenti si avvicendano in differenti combinazioni, d a due, nell'unica coppia dei loci omologhi disponibili nei cromosomi ogni individuo (Parenti 1955). I gruppi sanguigni scoperti dal Landste ner rispondono a questa modalità ereditaria. Alla agglutinine α β del plasma umano, corrispondono nelle emazie due agglutinogeni e B, e fra sè determinano l'agglutinazione. Si conoscono così quatt gruppi sanguigni: A (Aβ), B (Bα), AB (AB—), O (αβ). Dal punto vista medico pratico risulta che l'AB è ricettore universale e lo O è d natore universale.

È da notare che l'individualità del gruppo sanguigno è una sti mata costante connaturata allo zigote fino dal concepimento e durevo per tutta la vita. Oggi disponiamo della conoscenza di sottogruppi oltre a RH e MN, Lewis, ecc., ma dal punto di vista etnologico han più importanza generale quelli classici del sistema ABO, l'eredità d quali è dimostrata ormai da numerosi studi, sia sui gemelli (Verschu 1949, Gedda 1954, Gates 1948, Boyd 1939, Messeri 1946, ecc.), sia sul genealogie (Lattes 1934*a*), sia statisticamente (Gedda 1954, Verschu 1949, Boyd 1939, ecc.). I genitori di gruppi O hanno tutti i figli O, e ta possono anche nascere da genitori entrambi A o B oppure uno A e l'a tro B. Il fenotipo O è pertanto recessivo, A e B sono dominanti sullo mentre A e B sono fra loro isovalenti, dato che presentano nel grup AB le proprietà di entrambi. Sulla modalità di trasmissione ereditari si ammette generalmente la validità della ipotesi di Bernstein, second la quale si tratterebbe in concreto della presenza di tre fattori forman una serie unilocale (P.Q.R.) con la seguente corrispondenza geno-fen tipiche: A (PP oppure PR), B (QQ oppure QR), AB (PQ), O (RR). G accoppiamenti fenotipici diversi sono in numero di 10 e quelli genotipi 21 (Parenti 1955). Per poter determinare l'allelotipo raziale, indican con p la frequenza del gene P, e con q quella del gene Q e con r quel del gene R, la costituzione genica della popolazione risulta = pP + q + rR; e quella genotipica = p^2PP + 2prPR + q^2QQ + 2qrQR 2pqPQ + r^2RR; e quella fenotipica = (p^2 + 2pr) (A) + (q^2 + 2qr) (I + 2 pq (AB) + r^2 (O). Essendo p + q + r = 1 ne deriva che p + r

$- q$; $q + r = 1 - p$; e $p = 1 - \sqrt{b} + o$; $q = 1 - \sqrt{a} + o$; $r =$
$\overline{)}$, (BERNSTEIN 1959), avendo così la possibilità di calcolare p, q, r in
nzione di a, b, o, che deve essere uguale all'unità. Il controllo mate-
tico su esposto corrisponde alla realizzazione della ipotesi di Bern-
in ed è favorevole alla tesi della «poliallelia unilocale».

Premesse queste elementari nozioni etnogenetiche entriamo nel vivo
l'argomento che ci interessa, vale a dire nel rilievo delle stigmate
rologiche delle popolazioni saggiate in Somalia.

Si tratta di 300 soggetti somali di ambo i sessi (202 M, 98 F), appar-
nenti a numerose cabile che costituiscono i principali raggruppamenti
nici del popolo somalo. È da notare che non è facile per ogni individuo
ecificare la tribù di provenienza in quanto essendo nomadi questa
nte è solita spostarsi notevolmente dietro gli armenti transumanti.
munque possiamo pensare, come appare dallo spoglio delle schedine
otocollari, che la maggioranza dei saggi sia stata fatta su individui
ambo i sessi appartenenti sopratutto a tribù meridionali, giungendo
comprendere anche rappresentanti di cabile dell'Oltregiuba e dei Ba-
uni insediati sul confine del Kenia.

Su 300 somali sono stati accertati 175 del *gruppo O*, 81 del *gruppo*
. 40 del *gruppo B*, e 4 del *gruppo AB*, che in percentuale rispondono a
,3% di O; 27,1% di A, 13,3% di B e 1,33% di AB (fig. 1). A quanto ci
sulta sui Somali ha fatto dei rilievi sierologici anche il Tedeschi (in
IASUTTI 1959, Vol. I, pp. 270), che rispondono alle seguenti percen-
ali: A = 32%, B = 22,5%, AB = 5%, O = 41%. Ora se si considera
frequenze geniche nei due rilievi, si nota che nel nostro corrispon-
no a: P = 16, Q = 8, R = 76, e in quello del Tedeschi: P = 21,4; Q
15,4, R = 64,2. In base a questi elementi possiamo rilevare che le
fferenze fra i due saggi sono notevoli, con uno scarto del 5,4% per il
ne P; 6,5% per il gene Q in più nel reperto Tedeschi, e 11,8% in meno
r il gene R. Ciò sta a dimostrare che i rilievi in seno ad una popola-
one, per quanto assai omogenea, hanno sempre un valore relativo e
ssono oscillare anche molto fra valori estremi a seconda delle genea-
gie sottoposte allo studio, cosa già da noi ampiamente evidenziata a
oposito dell'inchiesta nazionale col test PTC (MESSERI 1959).

Dal grande numero di saggi eseguiti nelle più disparate popola-
oni del mondo (Vedi GENNA in BIASUTTI, pp. 270-272) abbiamo raggrup-
to nella Tabella I quelli che più interessano la comparazione per il
ostro studio. Dallo spoglio dei dati su ben 130 popoli diversi (WIE-
ER 1945) le frequenze geniche più vicine ai nostri rilievi in Somalia ap-

TABELLA I

	A	B	AB	O	P	Q	R
Somali (Moggi-Bavazzano)	27,1	13,3	1,3	58,3	16	8,9	76
Somali (Tedeschi)	32	22,5	5	41	21,4	15,4	64
Bantù (Dew)	23,6	19,7	2,2	54,5	13,8	11,6	73
Abissini (Winkel)	26,5	25,2	5,5	42,8	17,5	16,8	65
Irakeni (Boyd)	31,4	28,2	6,7	33,7	22,6	20,8	58
Messicani (Moss)	27,1	11,8	1,9	59,2	16	7,1	76
Samaritani (Yunowich)	25,1	11,2	2,2	61,5	14,7	6,9	78
Melanensi (Heydon)	26,8	16,3	3,2	53,7	16,4	10,3	73
Arabi-Libici (Tedeschi)	33	17,7	4,1	44	21,5	12,2	66
Fuegini e Peruviani (Lipschutz e Laretta)	—	—	—	100	—	—	100

partengono ai Messicani, notando soltanto piccole differenze per il g
Q (1,8%) e per il gene R (+ 0,8%), e nessuna differenza per il gene
Come si vede questa estrema somiglianza si riscontra in due popo
zioni, che per le loro posizioni geografiche si trovano ad essere così l
tane sia fisicamente che etnicamente, da non far sospettare alcuna
munione di origine. Ciò non deve peraltro meravigliare se si pensa
in questi casi non gioca tanto la parentela storica, quanto la selezi
ambientale che verosimilmente ha operato in maniera quasi anal
determinando sull'allelotipo raziale una simile «norma di reazio
(figg. 2, 3 e 4). Il raffronto con i Bantù mette in evidenza una
quenza del gene P maggiore (nei Somali) del 2,2% e minore del 2,
per il gene A, e maggiore del 2,2% per il gene R; pertanto esiste realm
te una certa analogia fra le due serie. Con gli Abissini i Somali da

saggiati presentano una minore frequenza dell'1,5% del gene P e del 7,9% del gene Q e maggiore frequenza del gene R del 10,6% e pertanto le differenze con gli abissini, popolo confinante e in gran parte etnicamente

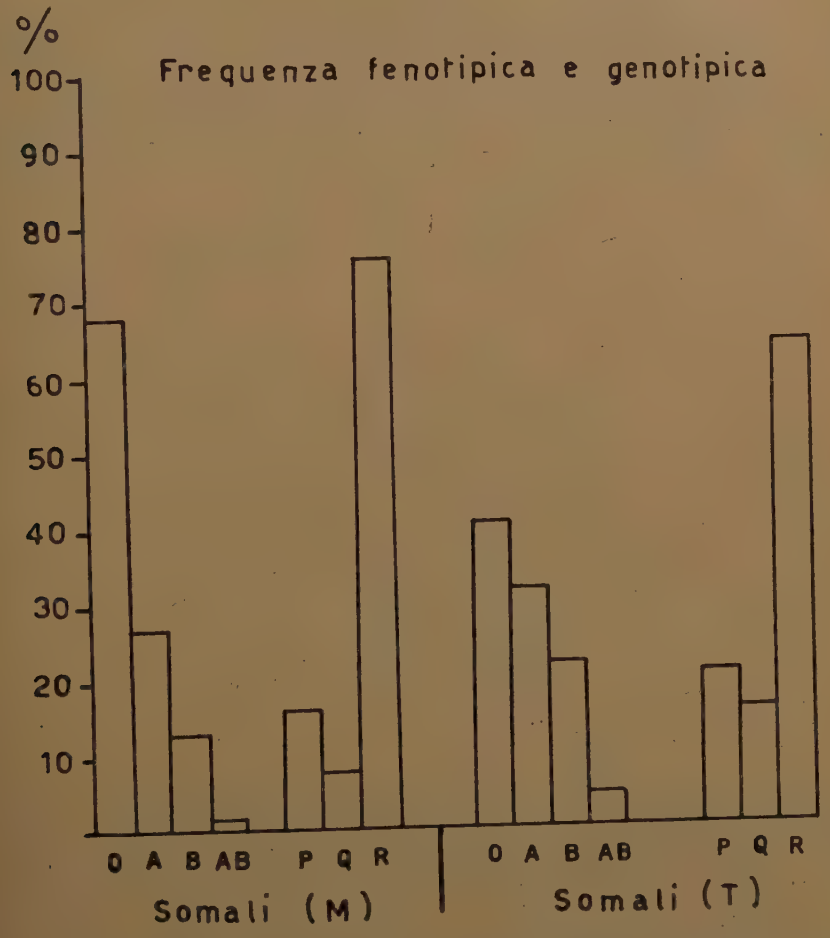


Fig. 2. — Gli istogrammi rappresentano la frequenza fenotipica e genotipica dei Somali studiati da noi e di quelli studiati dal TEDESCHI, per i gruppi sanguigni A, B, AB, O e le relative frequenze geniche P, Q, R.

incluso nella popolazione somala, appaiono più cospicue che rispetto ai bantù. Il raffronto con popoli molto lontani invece, relegati nella miriade insulare pacifica, dà dei segni di maggiore affinità. I melanesiani infatti in confronto con le tribù somale da noi studiate presentano una

maggior frequenza del gene P dello 0,4% e del gene Q dell'1,4% e minor frequenza del gene R del 2,7%. Gli arabi dai quali vantano la loro di scendenza quasi tutte le tribù somale, dimostrano invece una discret differenza frequenziale dei vari geni, con un aumento del 5,5% di H del 3,1% di Q, e diminuzione del 9,6% di R. Ancor maggiore la differem za dal ceppo irakeno (+ 6,6% P, e 10,9% Q e — 17,9% R) (fig. 5).

Ci si domanda ora come è possibile inquadrare le nostre osservazio ni comparative con le nozioni attuali sul valore antropologico dei gruppi sanguigni. Nelle grandi linee l'umanità, da questo punto di vista, po

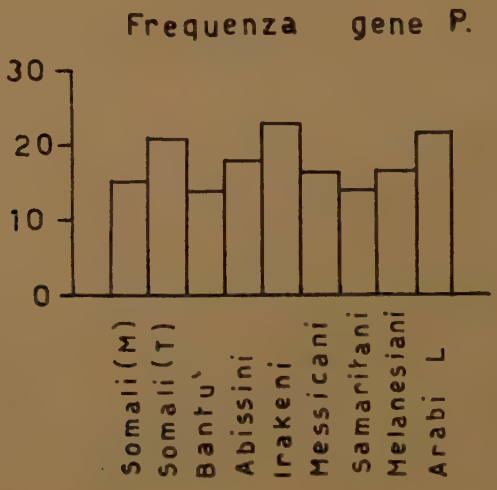


Fig. 3. — Frequenza del gene P fra vari popoli messi a confronto.

trebbe essere suddivisa in quattro categorie rispetto alle frequenze di P, Q, R; dato che esistono popolazioni con il solo R (come risulta presso certe tribù indiane dell'America e fra gli Arabi Ruala) e popolazioni con il gene R e P (come accade fra gli australiani e in alcune tribù esquimesi e lapponi e fra i baschi puri). Inoltre esistono popolazioni con R e Q, come si nota in alcune tribù indiane e birmane, ed infine seguono quasi tutti i popoli del mondo con i tre geni (R.P.Q.) variamente frequenti. In questa caratteristica trigenica, che risulta essere ormai la stigmata sierologica del genere umano, si distinguono dei gruppi a seconda della frequenza relativa di P e di Q. Si nota infatti che la percentuale del gene P è massima nell'Europa Occidentale (Portoghesi 30%) e diminuisce verso Oriente (Polacchi 28%, Russi 25%, Kirghisi 20%, Manciù 19%, Annamiti 16%, Sumatra 15%, ecc.). Al contrario il

ttore Q, si rivela decrescente dall'Oriente all'Occidente, (Annamiti %, Giavanesi 19%, Ungheresi 17%, Italiani 10%, Portoghesi 5%). La oria che l'umanità tragga una duplice origine: una occidentale (R + e una orientale (R + Q) secondo HIRSZFELD, non appare verosimile r le note ragioni che i monogenisti avanzano in difesa della loro tesi. ggi si preferisce attenersi alla ipotesi di BERNSTEIN, secondo la quale, rtendo dalla distribuzione universale di R, suppone che l'umanità imeva sia stata tutta del gruppo O e che successivamente siano com-

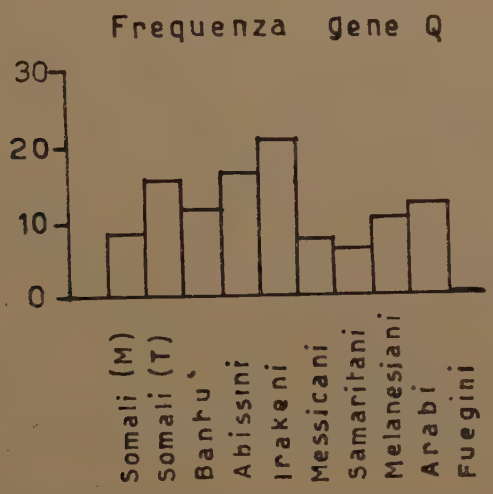


Fig. 4. — Frequenza del gene Q fra vari popoli messi a confronto.

arsi il mutante P e poi quello Q. Basandosi su questa tesi molto avvinente, sembra che gli Amerindi si siano staccati prima della mutazione e che gli Australiani si siano staccati fra la prima e la seconda mutazione (PARENTI 1955). Inoltre si sa che gli esami eseguiti sugli agglutinogeni secchi di mummie risalenti a vari millenni hanno dato una gamma di gruppi sanguigni simile a quella attuale (MONTAGÙ 1951). Le popolazioni amerinde sarebbero secondo alcuni etnologi di origine mongoloide, dato anche che, sia nelle mummie aleutine come in quelle peruviane, esiste il gruppo B, oggi scomparso (MONTAGÙ 1951, BOYD 1939, YATES 1948, ecc.). Persino negli antropoidi, per quanto pochi siano i saggi eseguiti, risulta che il gruppo O è scarsamente rappresentato a differenza della sua massima frequenza nell'uomo, forse derivando entrambi (sapiens e scimpanzè) da un comune antenato (BOYD 1950).

Secondo lo schema di Streng i vari popoli sono sistemati in modo
poter vedere la possibile diffusione nelle varie direzioni e fra loro,

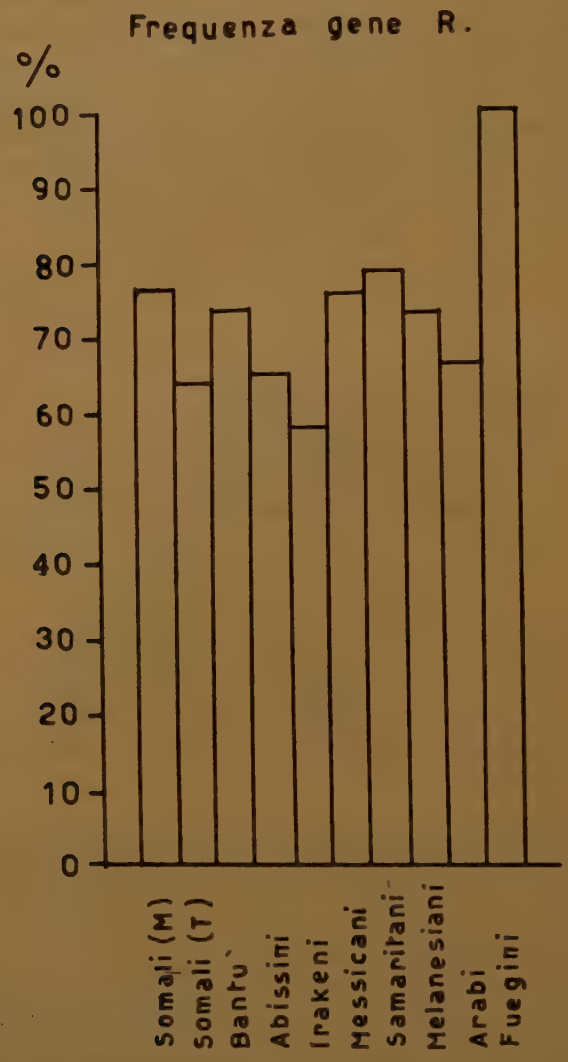


Fig. 5. — Frequenza del gene R fra vari popoli messi a confronto.

la visione talvolta è difficile date le frequenti eccezioni alle direttr
generali del fenomeno. Assai dimostrativa risulta anche, come osser
il GENNA in una accurata monografia sull'argomento, il riporto de
frequenze dei geni P, Q, R, su di un planisfero, come appare a col

cchio la distribuzione sierologica nella carta disegnata dal BIASUTTI, guita utilizzando specialmente i numerosi dati raccolti dal WIENER. ll'insieme di queste ricerche e delle sintesi dei relativi risultati ap- re abbastanza evidente che la distribuzione di questi geni segue una rma geografica (GENNA) e per quanto non vi sia stretta corrispondenza n i tipi raziali nei vari continenti, il BOYD ha proposto una classifica- ne sierologica (basata sui gruppi ABO, RH, MN) distinguendo sei i che comprendono: l'europeo ipoteticamente primitivo, il caucasoide, negroide, il mongoloide, l'amerindo e l'australoide. Questo criterio, rse troppo sintetico, corrisponde solo se concepito a grandi linee, sen- tener conto di numerosi particolari ed eccezioni (Vedi le carte del IASUTTI in *Razze e Popoli della Terra*, Vol. 1°, pp. 278-279).

Riguardo poi alla eredità del carattere e alla ipotetica omogeneità erologica dell'umanità primitiva (gruppo O) resta assai difficile com- rendere come certi popoli siano rimasti puri per questo carattere, come Fuegini per esempio, a meno che non si ammetta che la culla della manità sia esistita in quelle regioni così marginali. Questi popoli han- verosimilmente raggiunto l'insediamento attuale mediante lunghis- me peregrinazioni, attraversando una duplice serie di variazioni cli- atiche: dalla gelida Alascka ai torridi paesi centrali fino ai freddi lidi ella Terra del Fuoco. Se è verosimile l'origine mongoloide degli Ame- ndiani e se è vero il principio che anche le mutazioni così dette spon- nee sono in parte sollecitate da condizioni ambientali ostili, è da os- rvare che nessun popolo più di quello fuegino ha avuto tante solleci- zioni durante l'ipotetico esodo che inevitabilmente lo ha impegnato in dattamenti e reazioni ad ambienti fortemente ostili, selezionandolo se- eramente. In queste condizioni ci si chiede: come mai la originale pu- ezza sierologica (gruppo O) si è mantenuta tale fra tante vicende eco- giche, mentre in altri popoli le mutazioni del tipo P e Q (gruppo A e) si sono così vistosamente inserite nel patrimonio ereditario e tenace- ente protette dalla selezione naturale sono giunte a caratterizzare le tigmate di intere popolazioni continentali? Nessuna risposta logica può ssere data a questo interrogativo a meno che non si pensi che le muta- ioni avvengano per puro caso, senza una qualsiasi sollecitazione quale ppare invece estremamente necessaria nel campo sperimentale. Il fatto he si pensi ad un distacco di quei popoli prima dell'avvento mutazio- ale P o Q, non ci spiega perchè la lunga peregrinazione con le relative evere esigenze ecologiche non abbia selezionato fino alla scomparsa que- te tribù, altrimenti ci si chiede perchè sono avvenute le mutazioni P e) e perchè su queste gli ambienti hanno poi operato selettivamente. Si

può pensare invece che alla mutazione P o Q siano seguite mutazi
inverse col ritorno all'allelo normale R e che l'ambiente abbia sele
nato solo questi fenotipi O.

Comunque possa interpretarsi il comportamento dei gruppi sang
gni nei vari popoli, dobbiamo tenere conto che le stigmate sierologi

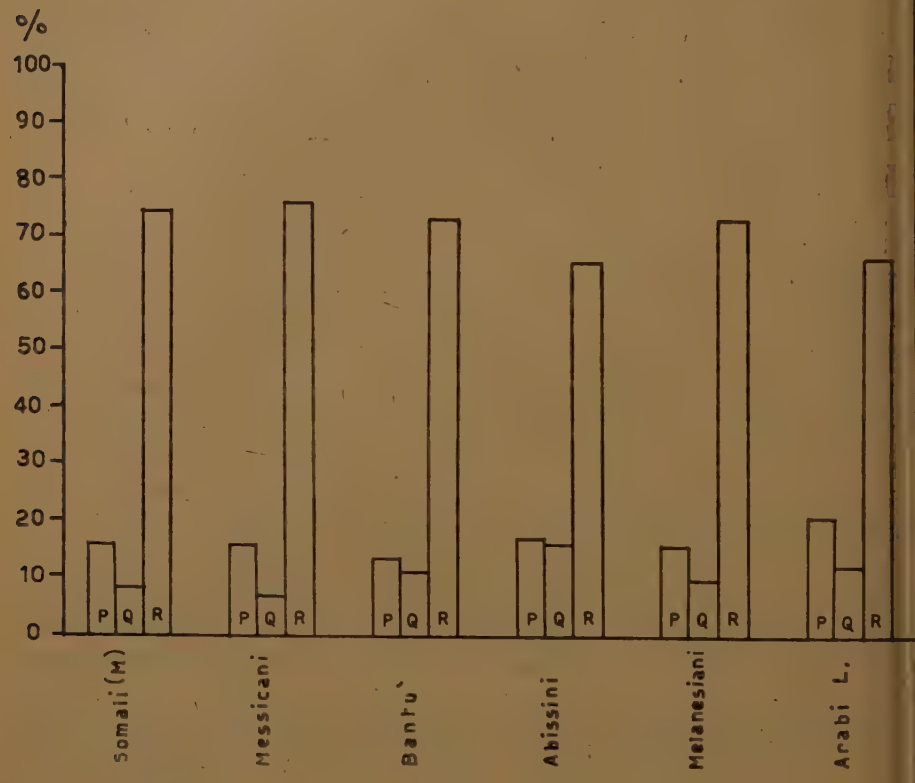


Fig. 6. — Frequenza dei geni P, Q, R dei Somali da noi studiati confrontata con qu
dei Messicani, Bantù, Abissini, Melanesiani ed Arabi Libici.

di una popolazione rappresentano degli indici non già dell'attuale
stituzione di un qualsiasi ceppo esistente, ma soltanto della sua sto
raziale (Gaire 1944). È con questa direttiva che noi abbiamo tentato
lumeggiare la posizione etnogeografica del popolo somalo, ma dato c
non si conosce nessuna relazione fra gruppi sanguigni e caratteri ant
pologici (Gaire 1944) possiamo fare solo un confronto sulle basi siero
giche in relazione alla tradizione storica.

Come già detto sopra, le tribù somale secondo il PUCCIONI sarebbero di derivazione etiopica, arabo e bantù. I cinque gruppi principali di cabile (Dir, Darod, Hauiya, Dighil, Rahanuin) dal nord al sud hanno un

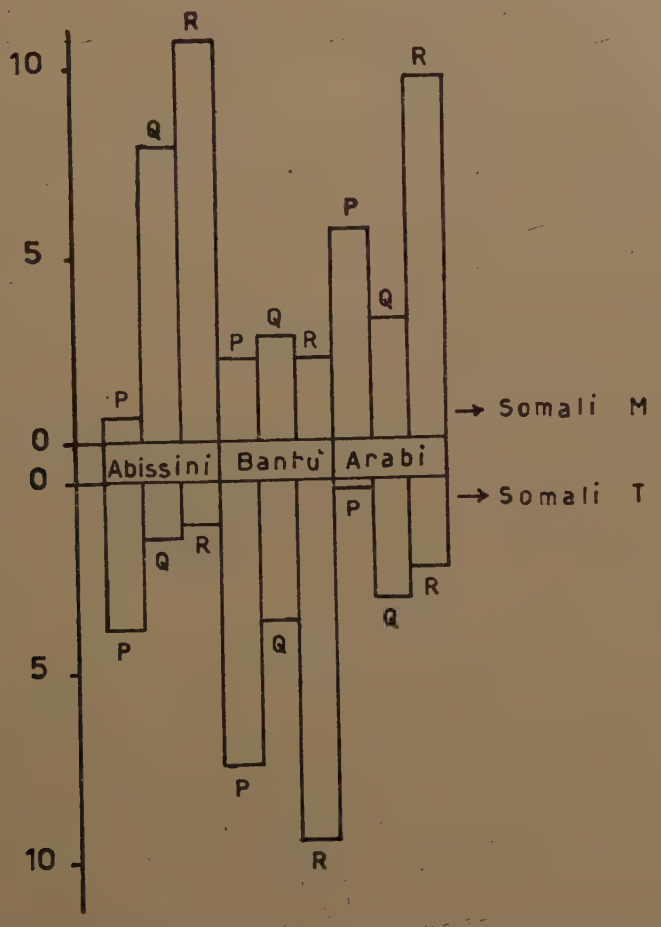


Fig. 7. — Scarto percentuale di allontanamento dei Somali (M) e dei Somali (T) dal genotipo dei popoli confinanti.

insediamento quanto mai instabile data l'indole nomade pastorale di queste popolazioni, per cui dal lato geografico è difficile seguirne le tracce spaziali mentre anche le caratteristiche raziali non sono tali da permettere una facile distinzione fra le varie cabile (fig. 1). Pertanto operando esclusivamente sui gruppi sanguigni (ABO) abbiamo tentato dei

raffronti o meglio degli avvicinamenti con i popoli che la tradizione sto rica e la situazione geografica ci indicano essere stati a contatto con l attuale popolazione somala. In base alle differenze geniche (P.Q.R.) ab biamo cercato di ricollegarci con l'antico substrato etnico dei Bantù (preesistenti all'arrivo dei Somali e dei Galla), e con quello dei Bon che furono forse i primi abitatori della Somalia meridionale, ed infin con gli Arabi e con gli Abissini.

In particolare abbiamo notato che le tribù da noi saggiate presen tano una somiglianza notevolissima con gli Abissini per la frequenz del gene P (con uno scarto dello 0,3%) ma nessuna analogia per la fre quenza del gene Q (scarto del 7,9%) e per quello del gene R (scart 10,6%). Maggiore somiglianza invece si manifesta col gruppo dei Bant con uno scarto del 2,2% per il gene P, del 2,7% per il gene Q, 2,2% per il gene R. Minore somiglianza con gli Arabi con scarto del 5,5% per il gene P; 3,3% per il gene Q, e 9,6% per il gene R (figg. 6 e 7). Se consideriamo invece i dati trovati dal Tedeschi su 1500 Somali, che forse rappresentano per certe cabile maggiore omogeneità essendo pi numerosi, troviamo che il raffronto presenta le seguenti caratteristiche (Vedi Tabella II): con gli Abissini lo scarto del 3,9% per il P, 1,4%

TABELLA II

Popolazioni	Abissini			Bantù			Arabi		
Geni dei gruppi sang.	P	Q	R	P	Q	R	P	Q	R
Frequenze dei geni	17,5	16,8	65,4	13,8	11,6	78.8	21,5	12,2	66,4
Scarto delle differenze frequenziali nei confronti dei Somali:									
1) Moggi - Bavazzano	<0,3	<7,6	<10,6	>2,2	<2,7	<2,2	>5,5	<3,3	>9,6
2) Tedeschi	<3,9	>1,4	<1,2	<7,6	<3,8	<9,6	>0,1	<3,2	<2,2

per il Q, e 1,2% per l'R. Con i Bantù lo scarto del 7,6% per il P, 3,8% per il Q e 9,6% per l'R. Con gli Arabi 0,1% per il P, 3,2% per il Q, e 2,2% per l'R.

Osservando i dati sinteticamente raggruppati nella Tabella II ap- e chiara una maggiore affinità delle cabile da noi saggiate verso i ıtù e successivamente verso gli Abissini e gli Arabi, mentre quelle giate dal Tedeschi appaiono sierologicamente più orientate per affi- genica verso gli Arabi e gli Abissini e molto meno verso i Bantù . 7).

In base a questi calcoli si potrebbe arguire che le cabile somale da studiate sono state maggiormente imparentate con i negri del sud uelle del Tedeschi invece con gli abissini dell'ovest e gli arabi della ta e del nord. Queste argomentazioni però hanno un valore limitato possibilità sierologiche offerte dal sistema ABO (che sarebbero più riminanti se completate con le ricerche su Rh e MN). È da notare ltre che esistono ancora molte zone oscure nella interpretazione geo- fica della distribuzione dei caratteri sierologici nel mondo (Lattes 4a, Gaire-1944, Biasutti 1959).

In ultima analisi si tratta di una indagine che ha potuto rivelare il metodo comparativo affinità più o meno pronunciate fra popola- ıi vicine e lontane che, malgrado talora molti millenni di separazione, sentano ancora dei legami sierologici di parentela. Ciò è stato osser- o anche da Jadin nelle sue ricerche sulle tribù pigmee dell'Ituri (Con- riuscendo ad individuare antiche parentele e a scoprire nette distin- ıi fra i gruppi negri confinanti. Secondo la teoria del Mollison le prietà organiche degli organismi sarebbero legate alle particolari utture delle molecole proteiche, per cui tali proprietà sarebbero col- ate con la disposizione stechiometrica della macromolecola proteica, ui varianti strutturali atomiche (proteali) sarebbero le responsabili ferenziali ed evolutive della specie. Il sangue che verosimilmente è uno tessuti più ricchi di queste intime proprietà biologiche, si presta mol- bene a manifestare queste stigmate differenziali che risultano tena- ıente legate alle leggi della eredità e per questo testimoni di antiche entele accennate nelle tradizioni storiche.

Col presente studio abbiamo cercato di portare un modesto contri- o alla conoscenza etnologica del popolo somalo, che sparso su un to territorio, ha trovato finalmente, sotto la guida e l'aiuto dell'Ita- la propria indipendenza.

Ci è grato rivolgere un particolare ringraziamento a tutti i compo- ti della Missione e specialmente agli autori dei saggi (Dott. Moggi e . Bavazzano) e ai colleghi direttori degli Ospedali di Mogadiscio e di isimaio (Prof. Cacciapuoti e Dott. Miotto) in quanto hanno valida- ıte contribuito alla raccolta dei dati sierologici.

BIBLIOGRAFIA

Biasutti R., 1959. — *Razze e popoli della terra*. Voll. I e II, Utet, Torino.

Bernstein F., 1930. — In: Biasutti 1959.

Boyd W. C., 1939. — *Blood grups*. Tabulae Biologicae. **17**, L'Aia.

—, 1950. — *Genetics and the races of man*. Little, Boston.

Ceppellini R., Nasso S. e Tezilazich F., 1952. — *La malattia emolitica del nec*
Istit. Sieroterapico, Milano.

Chiodi V., 1937. — *I Gruppi Sanguigni in relazione alla razza*. Archivio Antropol. E
67: 161-172.

Darlington C., 1953. — *I fenomeni della vita*. Macrí, Firenze.

Ford E. C., 1948. — *Genetica*. Longanesi, Milano.

Gaire M., 1944. — *I gruppi sanguigni in Antropologia*. Atti R. Accad. Peloritana
Natur., **46**: 2-23.

Gates R. R., 1948. — *Human Genetics*. MacMillan, New York.

Gedda L., 1954. — *Studio dei gemelli*. Orizzonte Medico, Roma.

Genna G. — In: Biasutti 1959.

Gianferrari L. e Cantoni G., 1942. — *Manuale di Genetica*. Vallardi, Milano.

Grottanelli G. — In: Biasutti 1959.

Jadin J., 1940. — *Les groupes sanguins des pigmees*. Falk, Bruxelles.

Latte L., 1934*a*. — *L'individualità del sangue*. Treves, Milano.

—, 1934*b*. — *Il sangue in Antropologia*. Treves, Milano.

Messeri E., 1946. — *Gemelli monocori*. Riv. Clinica Ped., **44**: 2-18.

—, 1955. — *Ecologia umana*. Archivio Antropol. Etnol., **85**: 17-81.

—, 1958. — *Considerazioni su un grande trattato di etnologia*. Riv. Geograf.
65: 1-20.

—, 1959. — *Comportamento della popolazione italiana di fronte al test PTC*. Caryo
12: 265-298.

Mollison T. — In: Genna.

Montagù M. F. A., 1951. — *An introduction to the physical Anthropology*. Th
Springfield.

Hirzsfeld L., 1938. — *Les groups sanguins*. Paris.

Parenti R. — In: Puccioni.

—, 1955. — *Biologia delle razze umane*. Goliardica, Pisa.

Puccioni N. — In: Biasutti 1959.

Rufie I., 1953. — *Les groupes sanguins chez l'home*. Masson, Paris.

Race R. and Sanger R., 1951. — *Blood groups in man*. Blakwell, Oxford.

Stern C., 1950. — *Principles of human genetics*. Freeman, S. Francisco.

SCHEINFELD A., 1952. — *L'ereditarietà*. Longanesi, Milano.
TEDESCHI A. — In: GENNA.
VERSCHUER O., 1949. — *Die Zwillingforschunng*. ASS, Bologna.
WIENER A. S., 1949. — *Blood groups and trasfusion*. Thomas, Springfield.

SUMMARY

The Author has studied the sierological characteristics of some Somaly tribes comparing them with those of neighbour people.

RIASSUNTO

L'A. ha studiato le caratteristiche fenotipiche sierologiche (ABO) di alcune tribù somale. Attraverso il computo delle frequenze geniche (p.q.r.) ha potuto fare dei raffronti con le popolazioni finitime, impostando le probabili parentele di queste tribù con un criterio di affinità sierologico, che corrisponde a quanto ci è noto della tradizione storica.

CHROMOSOME STUDIES OF SOME MEMBERS OF POLYGONACEAE

by

ARUN KUMAR SHARMA and TAPATI CHATTERJI

Cytogenetics Laboratory, Botany Department, Calcutta University, India *

(with Plate LXI-LXIII)

Received: 27th August 195

Introduction

Polygonum is a successful genus having a large number of specie occurring both in hills as well as in the plains. Its distribution is pra ctically cosmopolitan and representatives are found in a number of eco logical conditions in temperate, sub-temperate and tropical belts. I general the genus is represented by herbaceous members and most c its species occur in the wild state. In India, specially in the plains c Bengal as well as in the temperate regions of the Himalayas, quite significant number of the species has been recorded.

Taxonomic classification of this genus has been debated for a lon time. On the basis of morphological characters alone the genus wa delimited into a number of sections by certain authors (Meisner, 1856 Steward, 1930; etc.) whereas others (Rydberg, 1932; Small, 1892 an 1906, etc.) assign to them the rank of independent genera. Löve and Löv (1956) suggested that an intermediate scheme of classification is neede for the genus, in which some of the so-called sections are to be treate as genera and some may be retained as sections. Cytological studies i this genus with special reference to the interpretation of their taxonom have been carried out in detail by Löve and Löve (1956). Chromosom counts of several members of this genus have been made, in addition t above mentioned authors, by Schnack and Fernandage (1946); Castr and Fontes, (1946); Jaretzky, (1928); Wulff, (1939); Sugiura, (1936) Suzuka, (1950); Flovik, (1940); Skalinska, (1950). These studie show that in the genus *Polygonum* at least three different basic serie having x = 10, 11 and 17 chromosomes with their polyploid representa tives are present. Detailed cytotaxonomic work so far carried out o

* 35, Ballygunj Circular Road, Calcutta 19 (India).

this genus (Löve and Löve, 1956) has been centered around representatives mainly found in North America. In India though a large number of species of this interesting genus is recorded, no detailed cytological work uptil now has been carried out. As this genus has species easily available in India which present problems of cytotaxonomic interest and, also because lack of any detailed data on the Indian species, the present work was started.

In the present paper observations on nine different species and varieties of *Polygonum* and one of *Fagopyrum* — its allied genus, — have been incorporated, which form the first part of scheme of work undertaken here.

Materials and Methods

Materials

The present investigation was carried out on some species of the genus *Polygonum* and a species of *Fagopyrum*. These two genera fall under the tribe Eupolygonae of Hooker, of the family Polygonaceae. The following are the names of plants investigated :

1. *Polygonum alatum* Ham.
2. *Polygonum barbatum* Linn. (type I)
3. *Polygonum barbatum* Linn. (type II)
4. *Polygonum chinense* Linn.
5. *Polygonum glabrum* Willd.
6. *Polygonum hydropiper* Linn.
7. *Polygonum orientale* Linn.
8. *Polygonum plebejum* Br. Prodr.
9. *Polygonum runcinatum* Buch. Ham.
10. *Fagopyrum cymosum* Meissn.

Source of collection

The species, *P. plebejum, P. orientale, P. glabrum, P. barbatum* and *P. hydropiper* grow wild in comparatively marshy and waste areas in Calcutta and its suburbs. All are semiaquatic herbaceous plants and are mostly annual. Of these *P. glabrum* was collected from Indian Botanical garden - Sibpore, growing along the banks of river. *P. plebejum* was collected from Sarsuna area, near Calcutta. *P. hydropiper* was collected from Behala near Calcutta. *P. barbatum* and *P. orientale* grow

wild by the side of the tank of University College garden. The rest of the species viz. *P. alatum, P. chinense, P. runcinatum* and *Fagopyrum cymosum* were collected from Darjeeling. All the plants were grown in earthen-ware pots in the College garden.

In general for somatic divisional stages, root tips were collected from plants grown in the pots. For meiotic studies the plants were allowed to flower in the experimental garden and anthers were collected in due time.

Method

A. *Somatic chromosome*: To study the somatic chromosomes both temporary and permanent preparations of root tips were made of which temporary Aceto-Orcein squash preparations were found most suitable and karyotype analysis was done from them. It was very difficult to obtain perfectly scattered metaphase plates and well clarified morphology of chromosomes.

For temporary Aceto-Orcein squash preparation a number of pretreatment chemicals were tried to obtain well scattered and clear metaphase plates, namely 1) Saturated solution of Paradichlorobenzene (Sharma and Mookerjea, 1955); 2) Oxyquinoline (Tjio and Levan, 1950); 3) Coumarin (Sharma and Bal, 1954); 4) Saturated solution of Aesculin (Sharma and Sarkar, 1955); 5) Mono-Bromo-Napthalene (O'Mara 1948). Of these saturated solution Aesculin in cold proved best for all the species, though hours of treatment varied in each species which were determined by repeated trials. In case of *P. runcinatum* and *P. chinense*, a very little amount of Saponin was mixed with Aesculin solution which was found more suitable. For karyotype study however, pure Aesculin solution was used to have a comparative study of idiograms. In all cases Acetic-alcohol (1 : 1) fixation for one to three hours after the pretreatment was found absolutely indispensible.

After fixation the roots were hydrolysed and stained in a mixture of 2% Aceto-Orcein and Normal Hydrochloric acid (9 : 1) by heating over a flame for five to eight seconds and kept in that mixture for six to twenty-four hours. Due to the heavy cytoplasmic contents very much difficulty was encountered in staining the chromosomes. For this reason root tips were kept in the acid-dye mixture for a prolonged period. Subsequently, smearing was done in a drop of 1% Aceto-Orcein solution, applying a uniform but considerable pressure over the cover slip.

B. *Meiotic chromosomes*: To study the meiosis both temporary to-Carmine squash preparations and permanent preparations were e but temporary preparation was found to be comparatively better. In er to prepare permanent paraffin blocks the whole inflorescence was d as they are mainly racemes or heads. Fixation could not be suc- sfully done due to the densely crowded bracteoles which hampered penetration of the fixative and also the infiltration of paraffin. nce temporary Aceto-Carmine squash preparation was done to obtain meiotic stages.

The peak period of division for the somatic and meiotic cells was ween 10 A.M. - 2 P.M.

Figures were drawn at a table magnification of approximately X 0 using a Zeiss compensating eyepiece X 20 and 1.3 apochromatic ective with an aplanatic condenser. In the figures the chromosomes h secondary constrictions are drawn by outlines.

Observations

The somatic chromosome numbers of the different species of *Poly- um* so far investigated have been found to range from $2n = 20$ to = 60.

A detailed karyotype analysis of the different species reveals the ss similarity in complements of the different species. A critical lysis shows that minor alterations in the representatives of the types met with in different species which may be considered as criteria for identification of these species. The chromosomes are in general te short and the size difference between members of the complement not very marked. Because of the slow gradation in size, one type dually merges into the other. The main types which have been noted different species are described below:

Type A — Comparatively long chromosomes with submedian to rly median primary constrictions.

Type B — Comparatively long chromosomes each with two con- ictions, one primary and the other secondary. One of the constri- ons is nearly sub-median to sub-median in position and the other e sub-terminal at the distal end of the longer arm.

Type C — Comparatively long chromosome with two constrictions,

on primary and the other secondary. One of the constrictions is median and the other one is located at the distal end of the shorter a

Type D — Comparatively long chromosomes with nearly median primary constrictions.

Type E — Comparatively medium sized chromosomes with mee to sub-median primary constrictions.

Type F — Comparatively short chromosomes with median to median primary constrictions.

1. *Polygonum alatum* Ham.

Stem 1-2 feet high; leaves large, glandular; heads large; involu leaf large; perianth white; annual herb.

The somatic chromosome number of this species has been foun be $2n = 24$ (fig. 1). Chromosome size on an average is rather small the size difference is not marked (fig. 1a). Chromosomes of each gr gradually intergrade into the other. On the basis of relative siz the chromosomes, three groups can be identified. These are as follo

I. Seven pairs of comparatively long chromosomes.

II. Four pairs of comparatively medium sized chromosomes.

III. One pair of comparatively short chromosomes.

On the basis of detailed karyotype analysis, the somatic chro somes may be described in the following tabular form :

TABLE I

Type	Number	Length	Special features
C	2 pairs	3.3 - 3.16 μ	Similar to normal C type; one pair slig tly shorter than the other.
D	5 pairs	3.16 - 3 μ	Similar to normal D type.
E	4 pairs	3 - 2.51 μ	Similar to normal E type.
F	1 pair	2.33 μ	Similar to normal F type.

2. *Polygonum barbatum* Linn. (type I)

Branched, erect herb, leaves lanceolate, lower leaves are slig broader than the upper leaves and with a black patch in the ce Racemes 2-4; perianth white.

Somatic chromosome number of this species is $2n = 20$ (fig. 2). The chromosomes are in general small and size difference is not very marked (fig. 2a). Because of the slow gradation in size, one type gradually merges into the other.

According to the relative size difference chromosomes of this species may be divided into the following groups:

I. Six pairs of comparatively long chromosomes.

II. Three pairs of comparatively medium sized chromosomes.

III. One pair of comparatively short chromosomes.

Karyotype is represented in the following table:

TABLE II

Type	Number	Length	Special features
A	4 pairs	3.3 - 3.16 μ	Similar to normal A type. One pair is slightly shorter than the other.
B	1 pair	3.16 μ	Similar to normal B type.
C_2	1 pair	2.83 μ	Comparatively shorter than the normal C type. The satellite at the distal end is connected by a satellite thread.
E	3 pairs	2.83 - 2.5 μ	Similar to normal E type.
F	1 pair	2.3 μ	Similar to normal F type.

3. *Polygonum barbatum* Linn. (type II)

Branched, erect herb, leaves lanceolate to linear - lanceolate, nodes slightly swollen; flowers in raceme 2-4 in number; perianth white.

The somatic chromosome number in this species is $2n = 40$ (fig. 3). The chromosomes are in general quite short and size difference is not marked (fig. 3a). The chromosomes on the basis of size, may be divided into following groups:

I. Seven pairs of comparatively long chromosomes.

II. Eleven pairs of comparatively medium sized chromosomes.

III. Two pairs of comparatively short chromosomes.

The following table shows the detailed karyotype :

TABLE III

Type	Number	Length	Special features
B_1	1 pair	2.16 μ	Shorter than the normal B type and both of the constrictions are located at the sub-median positions at the two ends of the chromosomes.
C	1 pair	2.5 μ	Similar to normal C type.
C_1	2 pairs	2.16 μ	Similar to normal C type except that one constriction is median in position and the other sub-terminal.
D	3 pairs	2.16 μ	Similar to normal D type.
E	11 pairs	2.13 - 1.66 μ	Similar to normal E type; one pair slightly shorter than the others.
F	2 pairs	1.5 - 1.33 μ	Similar to normal F type.

The P.M.C. at first meiotic division show clear twenty bivalents at diakinesis (fig. 4) and in the polar view of metaphase I (fig. 5). Second meiotic division too shows clear twenty chromosomes in polar view of metaphase (fig. 6).

4. *Polygonum chinense* Linn.

Shrubby, glabrous herb; leaves from linear-oblong to oblong; crenulate, base truncate, rounded; acute; panicled or corymbose; involucral leaf absent.

The somatic chromosome number is $2n = 26$ (fig. 7). The chromosomes are in general medium sized. Size difference is not marked and chromosomes of each group gradually grade into the other (fig. 7a). On the basis of comparative length of the chromosomes, they may be classified into the following groups :

I. Four pairs of comparatively long chromosomes.

II. Seven pairs of comparatively medium sized chromosomes.

III. Two pairs of comparatively short chromosomes.

On the basis of the karyotype analysis, taken together with the e, the somatic chromosomes may be described through the following ble :

TABLE IV

Type	Number	Length	Special features
A	1 pair	4 μ	Similar to normal A type.
B	1 pair	3.83 μ	Similar to normal B type.
C	2 pairs	3.83 - 3.16 μ	Similar to normal C type; one pair is shorter than the other.
D	1 pair	3.83 μ	Similar to normal D type.
E	6 pairs	3.66 - 2.83 μ	Similar to normal E type.
F	2 pairs	2.5 - 2.16 μ	Similar to normal F type.

Polygonum glabrum Willd.

Stem 2-4 feet high; diffusely branched, red; leaves long, lanceolate linear-lanceolate, flowers in slender panicles, peduncles glabrous ed; perianth reddish-white.

The somatic chromosome number of this species is $2n = 60$ (fig. 8). hromosomes are in general quite short and size difference is not very arked.

Chromosomes are in graded series (fig. 8a). On the basis of compara- ve length the chromosomes may be classified into following groups :

I. One pair of long chromosome, longest in the set.

II. Five pairs of comparatively long chromosomes.

III. Sixteen pairs of comparatively medium sized chromosomes.

IV. Eight pairs of comparatively short chromosomes.

The detailed karyotype of the species is represented in the follow table :

TABLE V

Type	Number	Length	Special features
B	2 pairs	3.33 - 2.3 μ	Comparable to normal B type, one pair being much shorter than the other.
B_1	2 pairs	2 μ	Much shorter than normal B type and both the constrictions are located at the submedian positions at the two ends of the chromosome.
C	2 pairs	2.66 - 2.5 μ	Similar to normal C type.
D	2 pairs	2.16 μ	Similar to normal D type.
E	14 pairs	2 - 1.5	Similar to normal E type; two pairs are slightly shorter than the others.
F	8 pairs	1.33 - 1.16 μ	Similar to normal F type.

6. *Polygonum hydropiper* Linn.

Annual herbs; stems and branches rather stout; leaf glabro nodes swollen. Leaves entire linear-lanceolate, very variable in wi and in the length of the apex. Flowers on flexuous racemes leafy the base. Perianth white to pinkish-white.

Somatic chromosome number of this species is $2n = 22$ (fig. 9). T chromosomes are more or less short. Size difference is not marked. cause of the slow gradation in size one type gradually merges in to other (fig. 9a).

On the basis of relative length, the chromosomes may be classif into the following groups :

I. One pair of comparatively long chromosomes.

II. Nine pairs of comparatively medium-sized chromosomes.

III. One pair of comparatively short chromosomes.

On the basis of karyotype analysis, taken together with the size, e somatic chromosomes may be described in the following tables :

TABLE VI

Type	Number	Length	Special features
C	2 pairs	3.16 - 2.66 μ	Similar to normal C type. One pair is slightly shorter than the other.
C_1	1 pair	2.66 μ	Similar to normal C type except that one constriction is median in position and the other sub-terminal.
E	7 pairs	2.66 - 2.16 μ	Comparable to normal E type.
F	1 pair	1.83 μ	Similar to normal F type.

. *Polygonum orientale* Linn.

A branching annual, 3-10 feet high; softly pubescent, villous; leaves ong petioled, ovate to ovate-cordate, acuminate, stipules short. Flowers n cylindrical laxly panicled racemes. Bracts closed.

The somatic chromosome number of this species is $2n = 24$ (fig. 10). The chromosomes in general are short and size difference is not marked. Chromosomes are in graded series (fig. 10a).

On the basis of comparative chromosome length, they may be divided nto following groups :

I. Five pairs of comparatively long chromosomes.

II. Five pairs of comparatively medium sized chromosomes.

III. Two pairs of comparatively short chromosomes.

The detailed karyotype of this species is represented in the follow table :

TABLE VII

Type	Number	Length	Special features
B	1 pair	2.66 μ	Similar to normal B type.
B_1	1 pair	2.5 μ	Shorter than the normal B type and both the constrictions are located at nearly sub-median positions at the two ends of the chromosomes.
C	2 pairs	3.16 - 2.83 μ	Similar to normal C type. One pair is much shorter than the other.
D	1 pair	2.66 μ	Similar to normal D type.
E	5 pairs	2.53 - 2.16 μ	Similar to normal E type, one pair is slightly longer than the others.
F	2 pairs	1.66 μ	Similar to normal F type.

Besides the normal number $2n = 24$, nuclei containing differe chromosome numbers such as $2n = 22$ (fig. 11) were also observed.

The first meiotic division of the P.M.C. shows clear twelve bivale at diakinesis (fig. 12) and in the polar view of metaphase I (fig. 1 Second meiotic division too shows twelve chromosomes in polar vi metaphase (fig. 14).

8. *Polygonum plebejum* Br. Prodr.

Diffusely branched, prostrate herbs, flowers in axillary cyme; dicels short; perianth more or less near the base, white and red colour.

The somatic chromosome number of the species has been found be $2n = 20$ (fig. 15). Chromosome size on an average is very small a the size difference is not so marked; chromosomes of each group g dually grade into the other (fig. 15a). Taking into account the relat length of the chromosomes, they may be classified into the followi groups :

I. Two pairs of comparatively long chromosomes.

II. Four pairs of comparatively medium sized chromosomes.

III. Four pairs of comparatively short chromosomes.

On the basis of detailed karyotype analysis the somatic chromosomes may be described in the following table :

TABLE VIII

Type	Number	Length	Special features
B_1	1 pair	2 μ	Similar to normal B type except that both of the constrictions are located at the sub-median positions at the two ends of the chromosome.
C	1 pair	1.83 μ	Similar to normal C type, but comparatively shorter.
E	4 pairs	1.66 - 1.5 μ	Similar to normal E type except one pair of them has nearly sub-terminal primary constriction.
F	4 pairs	1.33 - 1.16 μ	Similar to normal F type.

Along with the normal number ($2n = 20$) noted above, nuclei containing varying chromosome numbers such as $2n = 15$, 18 (figs. 16, 17) were also observed.

The first meiotic division of the P.M.C.*s.* shows ten bivalents in diakinesis and polar view of metaphase I (figs. 18, 19). The second metaphase too shows clear ten chromosomes in each pole (fig. 20).

Besides normal plates P.M.C.*s.* with lagging bivalents in anaphase I, lagging chromosome at anaphase II and early separation are also recorded (figs. 21-23).

9. *Polygonum runcinatum* Buch. Ham.

Stem ascending from a creeping base, smooth; leaves runcinate, pinnatifid, glabrous, terminal lobe triangular, ovate-acuminate; petiole short with amplexicaul auricles. Heads large; involucral leaf absent.

The somatic complement of the species contains $2n = 22$ as the normal number (fig. 24). The chromosomes are in general quite short and size difference is not marked (fig. 24a). Taking into consideration, the comparative length of the chromosomes in the complement three groups of chromosomes may be identified :

I. Two pairs of comparatively long chromosomes.

II. Eight pairs of comparatively medium-sized chromosomes.

III. One pair of comparatively short chromosomes.

TABLE IX

Type	Number	Length	Special features
A	2 pairs	3 - 2.66 μ	Similar to normal A type. One pair is slightly shorter than the other.
B	1 pair	2.5 μ	Similar to normal B type, only slightly smaller in size.
C_1	1 pair	2.33 μ	Similar to normal C type except that one of the constrictions is median and the other sub-terminal. The type is shorter than the normal C type.
E	6 pairs	2.33 - 1.83 μ	Comparable to normal E type.
F	1 pair	1.66 μ	Similar to normal F type.

The P.M.C.*l.s.* during first meiotic division formed clear eleven bivalents in diakinesis (fig. 25) and in the polar view of metaphase I (fig. 27).

10. *Fagopyrum cymosum* Meissn.

Only one species of the genus has been worked out.

A tall branching perennial; leaves large; inflorescence very lax, flowers white.

Somatic chromosome number of this species is $2n = 32$. Chromosomes are in general quite short; size difference is not very marked. On the basis of the size, chromosomes of this species may be divided into the following groups:

I. Six pairs of comparatively long chromosomes.

II. Nine pairs of comparatively medium-sized chromosomes.

III. One pair of comparatively short chromosomes.

The detailed karyotype analysis reveals the following types of chromosomes.

Type A — Two pairs of comparatively long chromosomes, each having two constrictions, one primary and another secondary. One constriction is nearly sub-median, while the other nearly subterminal at the distal end of the longer arm. One pair is slightly shorter than the other.

Type B — One pair of comparatively long chromosomes having o constrictions, one primary and the other secondary, of which one nearly median and the other is sub-terminal in position at the distal d of the slightly shorter arm.

Type C — One pair of comparatively long chromosomes, each ving two constrictions, one primary and the other secondary. One nstriction is nearly median and the other is sub-terminal at the distal d of the longer arm.

Type D — Two pairs of comparatively long chromosomes with arly median to submedian primary constrictions.

Type E — Eight pairs of comparatively medium-sized chromo- mes with nearly sub-terminal to nearly sub-median primary constric- ons. The size difference is gradual.

Type F — One pair of comparatively medium-sized chromosomes ith sub-terminal primary constrictions. This type is shorter than E pe.

Type G — One pair of comparatively short chromosomes with bmedian primary constrictions.

Discussion

The species of *Polygonum* worked out in the text fall under diffe- nt sections under the genus. In Hooker's system of classification, *. plebejum* is included under Amblyogonon, *P. glabrum, P. barbatum* nd *P. hydropiper* under Persicaria and *P. alatum, P. runcinatum, . chinense* under Cephalophilon.

Regarding previous reports of chromosome number of these species, $n = 20$ and 22 chromosomes have been reported in *P. hydropiper* by ARETZKY (1928) and SOKOLOVSKAJA and STRELKOVA (1938) respectively. ut the observation on chromosomes in individuals of this species stu- ied here confirmed the report of SOKOLOVSKAJA and STRELKOVA. The ccurrence of plants with twenty chromosomes in body cells as reported y JARETZKY (1928) indicate further that in this species individuals with iffering chromosome numbers are in existence.

In *P. orientale,* discrepancies are noted between the previous and resent records. JARETZKY (1928) reported $2n = 22$ chromosomes whe- eas the present observation records 24 chromosomes in the normal

somatic complements of the same species. It is therefore apparent t in this species too as in *P. hydropiper* individuals exist in nature w different chromosome numbers. Chromosome counts of the rest of species excepting *P. plebejum* mentioned in the text, have all b made for the first time. They are $2n = 20$ in *P. plebejum*; 20 and 40 *P. barbatum;* 60 in *P. glabrum;* 22 in *P. runcinatum;* 24 is *P. alat* and 26 in *P. chinense.*

Intraspecific polyploidy is manifested in *P. plebejum.* $2n = 20$ ch mosomes have been reported in the text as against $2n = 40$ by JARETI (1928). It is evident that diploid counterparts of this species exist India. It is however yet to be seen as to whether the polyploid fo do occur in Indian plains too. The occurrence of both 20 and 40 ch mosomes in two individuals of *P. barbatum* suggests that in this also intraspecific polyploidy is prevalent. The two individuals di not only in chromosome number but in minute morphological charac as well. It is not certain whether the type with 40 chromosomes rep ents an autopolyploid derivation of the other. No multivalent format has been recorded in this type which obviously goes against their poss autopolyploid constitution. But at the same time it may be stated t chromosome size of *P. barbatum* being quite small and thus having chiasma frequency may not form multivalents after duplication. E then the karyotype analysis of these two species does not bear evidence of the direct duplication of chromosome set. So at the pres state of our knowledge it appears that different genomes might h been involved in the origin of the polyploid individual of *P. barbat* type II but the individuals represented by the genomes were not m kedly different in their phenotypic characters. In that case it is to be assumed that *P. barbatum* may have a number of varieties nature which differ not only in minute morphological characters also in their genomic constitution.

The possible mode of origin of different chromosome series in genus *Polygonum* needs discussion. As it appears, three series of ch mosome numbers starting with 10, 11 and 17 chromosomes (vide D LINGTON and WYLIE, 1955) have been found in this genus. A num of species showing polyploid multiples of these basic sets have been corded. It is not known however as to how far these different se represent parallel lines of evolution. The present investigation ta in conjunction with a careful analysis of the previous report seems throw some light in this direction.

It has been pointed out that in *P. hydropiper,* individuals with 20 nd 22 chromosomes have been reported. Similarly in *P. bistorta,* 44 nd 46 chromosomes are reported by different authors (JARETZKY, *l. c.*; OKOLOVSKAJA and STRELKOVA *l. c.*). Another case may be cited of *P. viiparum* where in the same species 88, 100, 110, 132 chromosomes (SoKOLOVSKAJA and STRELKOVA, 1938; FLOVIK, 1940; LÖVE and LÖVE 1948; SKALINSKA, 1950) have been reported. These counts may indicate that difference in chromosome numbers between different species should not e considered as a very valid criterian for their identification. All these different numbers seem to be very much related to each other and show asy derivation one from the others. It appears therefore that as $n = 10$ hromosomes is the lowest so far recorded in the genus *Polygonum* it epresents the basic set from which all other numbers are derived. In ther words it can be said that the remarkable uniformity in the chroosome complements of different species shows a conspicuous homogeneity and that the slight differences noted between them are not of ny phylogenetic significance, as such deviations are still continuing at n intraspecific level. This deviation involving increase in chromosome umber possibly arises through non-disjunction.

The above assumption has its implications on the taxonomy of the enus. If this suggestion is taken to be correct then the treatment of different sub-sections of the genus as independent genera as proposed y some taxonomists (RYDBERG, 1932; SMALL, 1892 and 1906, ecc.) finds o justification. At least so far as these species are concerned, they epresent a homogeneous assemblage and as such they should be included in a common genus. They represent divergent lines of evolution in different directions from a common stock. More investigations are however desired in this connection. It is worth noting in this connection hat LÖVE and LÖVE, while dealing with the North American species of he genus *Polygonum,* have shown a remarkable homogeneity in chromosome number within its species.

How far these different numbers have originated through asexual r through sexual process is yet to be determined. As slight variation n chromosome number was noted within the somatic tissue and as both sexual and vegetative reproduction occur in abundance, the possibility f their origin through either or both means is there.

In addition to the role of aneuploidy and polyploidy played in the volution of species of *Polygonum* the importance of structural alter-

ations of chromosomes in this process cannot be ignored. No doubt th karyotypes of the different species reveal six grossly divisible typ of chromosomes (A - F) — an indication of their homogeneity, min differences in the complement are always there distinguishing one sp cies from another. The different karyotypes differ with respect to th number of secondary constrictions present in the complements as we as the number of times each type is represented in them. These min differences which have been worked out after observation on a lar number of plates, from materials fixed in a common fixing fluid, reve clearly that every species can be identified on the basis of its karyoty This is a clear indication of the importance of structural alterations chromosomes in the evolution of species.

Summary

The present paper deals with a detailed cytological investigation nine different species and varieties of *Polygonum* and one species *Fagopyrum*. The following are the names of plants investigated.

1. *Polygonum alatum* Ham. ($2n = 24$)
2. *Polygonum barbatum* Linn. type I ($2n = 20$)
3. *Polygonum barbatum* Linn. type II ($2n = 40$)
4. *Polygonum chinense* Linn. ($2n = 26$)
5. *Polygonum glabrum* Willd. $2n = 60$)
6. *Polygonum hydropiper* Linn. ($2n = 22$)
7. *Polygonum orientale* Linn. ($2n = 24$)
8. *Polygonum plebejum* Br. ($2n = 20$)
9. *Polygonum runcinatum* Buch. Ham. ($2n = 22$)
10. *Fagopyrum cymosum* Meissn. ($2n = 32$).

2) Present work reveals that both polyploidy and aneuploidy conjunction with structural alterations of chromosomes have played significant role in the evolution of species in this genus.

3) An analysis of previous and present data show that differe chromosome numbers exist in different individuals of the same speci such as in *P. hydropiper* and *P. orientale*. These differing chromoso

umbers are close to one another and show possible derivation of one rom the other.

4) Intraspecific polyploidy has been recorded in *P. barbatum* and *P. plebejum*. Absence of any multivalent in *P. barbatum* may suggest s allopolyploid constitution, involving origin through two different arieties of the same species.

5) Chromosome analysis of different species shows gross uniformity in morphology and in number, and it is assumed that all these different numbers are derived ultimately from a single basic set. The minor karyotypic differences between species can account for their pecific status. A careful analysis of present and previous records suggests that different species of this genus represents divergent lines of evolution from a common basic stock.

6) Species with different chromosome numbers have been assumed o have originated both through sexual and asexual means.

REFERENCES

Castro D. De and Fontes F. C., 1946 *. — Brot. Ciênc. Nat., **15**: 38.

Darlington C. D. and Wylie A. P., 1955. — *Chromosome atlas of flowering plants.* George Allen and Unwin Ltd., London.

Flovik K., 1940. — *Chromosome numbers and polyploidy within the flora of Spitzbergen.* Hereditas, **26**: 230-240.

Jaretzky R., 1928. — *Histologiche and karyologiche studien an Polygonaceae.* Jharb. f. Wiss. Bot., **69**: 357-490.

Löve A. and Löve D., 1948. — *Chromosome numbers of northern plant species.* Reykjavik.

—, 1956. — *Chromosomes and taxonomy of Easten North American Polygonum.* Canad. J. Botany, **34**: 501-521.

Meisner C. F., 1856. — *Polygonaceae.* In De Candolle: Prodromus Systematis Naturalis, etc., **14**: 28-186.

O'Mara J. G., 1948. — *Acetic acid methods for chromosome studies at prophase and metaphase in meristems.* Stain Techn., **23**: 201-204.

Rydberg P. A., 1932. — *Flora of the prairies and plains of central North America.* New York Botanical garden, New York.

Schnack B. and Fernandez O., 1946 *. — Bol. Soc. Argent. Bot., **1**: 285.

Sharma A. K. and Bal A. K., 1953. — *Coumarin in chromosome analysis.* Stain Techn 28 : 255-257.

Sharma A. K. and Mookerjea A., 1955. — *Para-dichlorobenzene and other chemicals chromosome work.* Stain Techn., 30 : 1-7.

Sharma A. K. and Sarkar S. K., 1955. — *A new technique for the study of chromosom in Palms.* Nature, 176 : 261.

Skalinska M., 1950. — *Studies in chromosome numbers of Polish angiosperms.* Act Soc. Bot. Polon., 20 : 45-68.

Small J. K., 1892. — *A preliminary list of American species of Polygonum.* Bull. Torre Bot. Club, 19 : 351-370.

—, 1906. — *Manual of the South eastern Flora*, etc. Second edition. New York.

Sokolovskaja A. and Strelkova O., 1938 *. — C. R. Acad. Sci. U.R.S.S., 21 : 68.

Steward A. N., 1930. — *The Polygonaceae of Eastern Asia.* Contribs. Gray. Herb rium, 88 : 1-123.

Sugiura T., 1936 *. — *Studies on the chromosome numbers in higher plants, with speci reference to Cytokinesis. I.* Cytologia, 7 : 544.

Suzuka O., 1950a *. — Rep. Kihara. Inst. Biol. Res., 4 : 57.

—, 1950b *. — Jap. J. Genet., 25 : 17.

Wulff H. D., 1939 *. — Ber. Deut. Bot. Ges., 57 : 424.

---

* Referred in *Chromosome Atlas of flowering plants*, by Darlington and Wyl 1955.

EXPLANATION OF PLATES LXI-LXIII

Plate LXI

Fig. 1 — *Polygonum alatum*. Somatic metaphase showing 24 chromosomes.

Fig. 2 — *P. barbatum* (type I). Somatic metaphase showing 20 chromosomes.

Fig. 3 — *P. barbatum* (type II). Somatic metaphase showing 40 chromosomes.

Fig. 7 — *P. chinense*. Somatic metaphase showing 26 chromosomes.

Fig. 8 — *P. glabrum*. Somatic metaphase showing 60 chromosomes.

Fig. 9 — *P. hydropiper*. Somatic metaphase showing 22 chromosomes.

Figs. 10-11 — *P. orientale*. Somatic metaphase stages showing 24 and 22 chromosome respectively.

Figs. 15-17 — *P. plebejum*. Somatic metaphase stages showing 20, 15 and 18 chromosome respectively.

g. 24 — *P. runcinatum*. Somatic metaphase showing 22 chromosomes.
g. 27 — *Fagopyrum cymosum*. Somatic metaphase showing 32 chromosomes.

PLATE LXII

gs. 4-6 — *Polygonum barbatum* (type II). Diakinesis, first meiotic metaphase and second meiotic metaphase respectively.
gs. 12-14 — *P. orientale*. Diakinesis, first meiotic metaphase and second meiotic metaphase respectively.
gs. 18-23 — *P. plebejum*.
gs. 18-20 — Showing diakinesis, first meiotic metaphase and second meiotic metaphase respectively.
g. 21 — First meiotic anaphase with 2 lagging bivalents.
g. 22 — Second meiotic anaphase with one lagging chromosome.
g. 23 — Early separation of bivalents.
gs. 25 and 26 — *P. runcinatum*. Diakinesis and first meiotic metaphase respectively.

PLATE LXIII

gs. 1*a*, 2*a*, 3*a*, 7*a*, 8*a*, 9*a*, 10*a*, 15*a*, 24*a* and 27*a* — Idiograms of *P. alatum*, *P. barbatum* (type I), *P. barbatum* (type II), *P. chinense*, *P. glabrum*, *P. hydropiper*, *P. orientale*, *P. plebejum*, *P. runcinatum* and *Fagopyrum cymosum* respectively.

RIASSUNTO

Lo studio citologico su alcuni membri della famiglia delle Polygonaceae ha portato alla determinazione del numero cromosomico di nove specie di *Polygonum* e di una specie di *Fagopyrum*, e precisamente: *Polygonum alatum* Ham. $2n = 24$; *P. barbatum* L. tipo $2n = 40$; *P. barbatum* L. 2° tipo $2n = 40$; *P. chinense* L. $2n = 26$; *P. glabrum* Willd. $2n = 60$; *P. hydropiper* L. $2n = 22$; *P. orientale* L. $2n = 24$; *P. plebejum* Br. $= 20$; *P. runcinatum* Buch. Ham. $2n = 22$; e *Fagopyrum cymosum* Meissn. $2n = 32$.

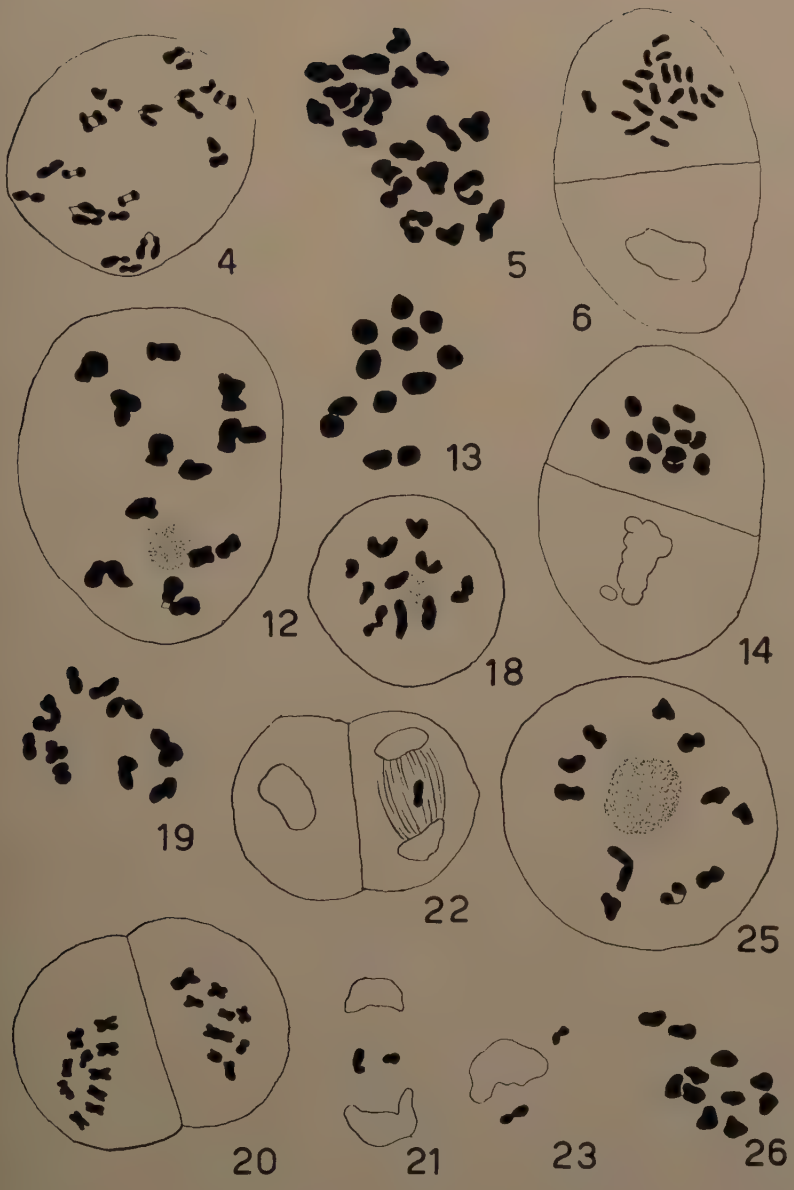
Tanto la poliploidia quanto l'aneuploidia insieme con alterazioni strutturali dei cromosomi sono stati strumenti dell'evoluzione della specie in questo genere.

Un'analisi dei dati nuovamente acquisiti assieme a quelli noti precedentemente dimostra che numeri differenti di cromosomi esistono nei diversi individui della stessa specie, come in *P. hydropiper* e *P. orientale*. Questi numeri sono fra loro collegati e probabilmente derivati l'uno dall'altro.

Poliploidia intraspecifica si ritrova in *P. barbatum* e *P. plebejum*. L'assenza di multivalenti in *P. barbatum* può far supporre la sua costituzione allopoliploide implicante la sua origine da due varietà della stessa specie.

L'analisi cromosomica di differenti specie mostra una grande uniformità nella m
fologia e nel numero dei cromosomi, e fa pensare che questi differenti numeri si
derivati in definitiva da un unico numero base. Le differenze cariotipiche di min
entità fra le specie confermano la loro effettiva natura specifica. Le differenti specie
questo genere rappresentano linee evolutive divergenti da un ceppo ancestrale comu
Si suppone che le specie con differenti numeri cromosomici si siano originate attrave
processi sia sessuali sia asessuali.

A. K. Sharma and T. Chatterji — Chromosome studies of some members of Polygonaceae.



A. K. SHARMA and T. CHATTERJI — Chromosome studies of some members of Polygonaceae.

. K. Sharma and T. Chatterji — Chromosome studies of some members of Polygonaceae.

RENZO STEFANI

L'AZIONE DELLA COLCHICINA SULLE CELLULE DELL'EPITELIO FOLLICOLARE OVARICO DEGLI EMBIOTTERI

(con Tavola LXIV) *

In redazione: il 9 Aprile 1960.

Le numerosissime ricerche riguardanti gli effetti della colchicina su animali e piante condotte in questi ultimi trent'anni, oltre a dimostrare definitivamente la tipica azione statmocinetica di questo veleno mitotico sulla cellula in moltiplicazione, ne hanno indicato varie utilizzazioni sia nella ricerca pura (embriologia sperimentale, cariologia, ecc.) sia nella applicazione (farmacologia, induzione della poliploidia nelle piante agrarie).

Nella serie di ricerche sulla cariologia degli Embiotteri, era stata da me più volte riconosciuta la grande difficoltà nella valutazione dell'entità del corredo cromosomico soprattutto nello studio della poliploidia somatica embrionale dove le mitosi decorrono velocissime ed i cromosomi sono assai poco differenziabili e male individuabili.

Rifacendomi pertanto ai brillanti risultati ottenuti nei vegetali mediante il blocco delle mitosi colchicinizzate e tenuto conto soprattutto del fenomeno di accumulo delle c-metafasi che potrebbe permettere una analisi cariologica più completa dei vari organi, ho creduto opportuno saggiare l'effetto della colchicina sugli Embiotteri, stabilirne le concentrazioni più adatte per un risultato ottimale c-mitotico, studiare la evoluzione della c-mitosi e vedere se fosse possibile l'induzione della poliploidia.

Riguardo quest'ultimo aspetto, soprattutto, pensai che una ricerca in tal senso avrebbe potuto portare un qualche contributo alla dibattuta questione della poliploidia sperimentale da colchicina negli animali. Se nei vegetali la sperimentazione ha dato ottimi frutti e si è dimostrata suscettibile di vaste applicazioni, le ricerche analoghe su animali hanno fornito invece risultati assai meno appariscenti anzi, direi, per la maggior parte negativi.

* Lavoro eseguito nell'Istituto di Zoologia dell'Università di Cagliari.

Tuttavia non sono mancati Autori che hanno sostenuto la possibilità di una induzione sperimentale della poliploidia, come Häggqvist (1948, 1951) in Anfibi, ratti e nel maiale, Peters (1946) in *Triturus viridescens*, Barber e Callan (1943) in *Triton*, Lüscher (1946) in *Xenopus*, Barigozzi (1942) in *Artemia salina*, Hirobe (1939) nel baco da seta, Inoba (1940) in *Habrobracon*, Gelei e Csik (1939) e Braungart-Ott (1942) in *Drosophila*, Sokolov (1939) in *Chorthippus*, Higbee (1942) nel pollo, Comandon e De Fonbrune (1942) in *Amoeba*, Schreiber e Pellegrino (1951) in *Triatoma*.

Ma la poliploidia indotta, determinata spesso con metodi più o meno approssimati (volume nucleare, numero dei nucleoli in nucleo interfasico, quantità di cromatina, dimensioni delle teste degli spermatociti, ecc.) è stata discussa e posta in dubbio in molti dei lavori sopraricordati (Cfr. Beatty, 1949, 1951, 1952; Eigsti e Dustin, 1957). Questi ultimi due Autori, dopo una disamina dei risultati nel campo della poliploidizzazione da colchicina, concludono sostenendo che animali poliploidi da colchicina non sono stati ancora mai prodotti con sicurezza, a differenza di quanto invece si è ottenuto con altre metodiche (shock da temperatura, ecc. cfr. Fankauser, 1942, 1945).

Molto probabilmente la tossicità della colchicina gioca un ruolo di grande importanza. Negli animali l'arresto metafasico da colchicina è fatale (azione citoclasica di Lehmann), mentre nelle piante, come è noto, si possono avere fino a 7 cicli c-mitotici susseguenti (D'Amato) e grande capacità di ripresa (*Recovery*).

Si tratta probabilmente di una diversa reazione della cellula animale all'alcaloide di fronte a quella vegetale, sebbene Eigsti e Dustin (lav. cit.) sostengano che il successo «*is probably only a question of technique*».

Nella presente ricerca ho scelto, quale *test* istologico, l'epitelio follicolare ovarico per diverse ragioni. Innanzitutto perchè la sua struttura e la sua evoluzione ontogenetica sono ben note (Stefani, 1955, 1956) e quindi permettono una esatta valutazione dell'azione dell'alcaloide, poi perchè tale tessuto non presenta la poliploidia somatica naturale, ancora, perchè vi si trovano continuativamente le mitosi, sebbene con frequenza variabile secondo lo stadio di sviluppo dei singoli oociti, infine, per la situazione topografica dell'ovario, sospeso nella cavità emocelica, che permette un immediato contatto con il farmaco iniettatovi.

Per la iniezione si è usata una microsiringa, all'uopo costruita, accoppiata ad una vite micrometrica a scatto che permette di iniettare piccolissime e costanti quantità di liquido. Dopo varie prove preliminari

o creduto opportuno mantenere costante la quantità di soluzione per utti gli esperimenti, che è stata fissata in mm. cubi 1,4360 (corrispondente ad un singolo scatto della micrometrica).

È stata usata colchicina purissima cristallizzata della Ditta Merck isciolta in acqua distillata a varie proporzioni. Si è praticata un'unica niezione per individuo. Le soluzioni usate sono state le seguenti : 0,05%, ,1%, 0,2%, 0,4%, 1%.

Gli esperimenti vennero effettuati su neanidi e femmine adulte giovani di *Haploembia solieri* partenogenetica (biotipo diploide tetrasomico $2n = 22$ e biotipo triploide $2n = 33$).

Gli animali colchicinizzati vennero mantenuti, insieme a quelli di controllo, ad una temperatura costante di 20-22°, per tutto il periodo degli esperimenti. A determinate distanze di tempo dall'iniezione, gli animali venivano fissati in Carnoy. I tempi di fissazione sono stati, per ogni soluzione : 30_m, 1^h, 2^h, 3^h, 4^h, 8^h, 12^h, 24^h, 48^h, 72^h. I preparati vennero allestiti con la tecnica dello schiacciamento usando come colorante l'orceina acetica.

In questo lavoro che costituisce soltanto un saggio preliminare, come ho già detto, non ho effettuato conteggi e quindi non fornisco dati quantitativi, ma mi limito alla descrizione delle varie reazioni del nucleo mitotico alla droga.

Risultati degli esperimenti e discussione

Inizierò l'esame e la discussione dei reperti per le varie concentrazioni usate, da quella (0,2%) che si è dimostrata la più adatta per una tipica induzione c-mitotica. Da questa passerò quindi all'esame delle concentrazioni più elevate (0,4% ed 1%) in cui si hanno effetti tossici molto marcati, e di quelle più basse (0,1%, 0,05%) con le quali si hanno reazioni più attenuate o nulle.

Concentrazione 0,2% : Tale concentrazione, nella dose di trattamento di mm. cubi 1,4360, si è rivelata ottimale per una tipica induzione c-mitotica.

Già a 30 minuti primi dall'iniezione, si notano i primi effetti dell'azione statmocinetica. Il quadro mitotico comparato a quello dei controlli, è il seguente :

Controllo: Presenza di tutti gli stadi mitotici distribuiti casualmente nell'epitelio follicolare degli ovarioli.

Trattamento: 30 m.: Scomparsa delle anafasi e delle telofasi nc mali. Presenza di c-metafasi insieme alle quali si possono repertare pr metafasi e profasi normali, come nei controlli. Nessuna degenerazio picnotica nucleare. Le c-metafasi, in questo periodo, hanno una freque za pressapoco uguale a quella delle metafasi normali dei controlli. cromosomi c-metafasici appaiono nella loro massima contrazione mit tica e sono costituiti dai due cromatidi nella tipica disposizione di a paiamento, uniti al centromero (Fig. 1).

Dopo 1-4^h, va gradualmente aumentando il numero delle c-metafa per evidente fenomeno di accumulo, mentre permangono completamen assenti gli stadi di anafase e telofase. Si possono repertare invece, ne proporzioni del controllo, stadi profasici e pro-metafasici nella loro pica morfologia. Nelle c-metafasi non si notano ancora fenomeni ev denti di *stickiness* tra i cromatidi delle varie coppie né fenomeni picnosi nucleare. D'altra parte, però, lo stadio c-metafasico non appa evolversi in una c-anafase in cui i cromatidi si dovrebbero trovare a paiati ma staccati dal centromero.

I cromatidi rimangono uniti fra loro. I cromosomi c-metafasici so irregolarmente distribuiti nel citoplasma, senza una orientazione par colare (*unoriented metaphase* di DUSTIN), isolati per lo più tra lo (*exploded type*). Non si hanno ammassi metafasici (*ball*) nè metafa multiple (*multiple stars*) ma le c-metafasi permangono costantemen nel loro aspetto descritto sopra.

Dopo 4-8^h, le c-metafasi continuano ad aumentare di numero ma una certa percentuale di esse (probabilmente negli stadi più avanzati) incomincia a notare una ulteriore contrazione dei cromosomi con u parziale o totale agglutinazione dei cromatidi nelle varie paia (Fig. A volte, si nota pure agglutinazione tra diverse paia. Permane l'assen di anafasi e telofasi mentre le profasi, di aspetto normale, si mantengo pressapoco nelle stesse proporzioni dei preparati precedenti.

Dopo 8-48^h, si hanno sempre più evidenti fenomeni di agglutinazio a carico di un sempre maggior numero di c-metafasi. I cromatidi si a glutinano completamente formando masserelle cromatiche che, fonde dosi insieme più o meno completamente (Fig. 3) formano successiv mente i nuclei picnotici (Fig. 4) che si presentano con sempre maggi frequenza man mano che si protraggono i tempi di osservazione.

A 72^h, i fenomeni degenerativi vanno sempre più aumentando, me tre altre c-metafasi si accumulano. Singoli preparati in tempi success hanno dimostrato che tale quadro degenerativo va aumentando fino al morte dell'animale.

Nessuna figura cariocinetica fa supporre, neanche lontanamente, na evoluzione c-mitotica nel senso di una ricostituzione interfasica per estituzione nucleare ed instaurazione di un corredo cromosomico poli-loide.

L'interpretazione di questi reperti appare evidente: Nella dose iniet-ata, l'alcaloide, appena a contatto col tessuto, induce, come di norma, n arresto metafasico. La colchicina, nella concentrazione usata, sem-ra non avere alcuna influenza sulla profase come confermato dalla pre-enza di un normale numero di profasi che via via si presentano nel essuto colchicinizzato e che si evolvono successivamente in c-metafasi leterminando il loro accumulo.

Tale arresto, che si prolunga oltre misura fino a dare i fatti dege-nerativi già descritti (agglutinazione e picnosi), determina la scomparsa degli stadi mitotici successivi (anafase e telofase) come è stato consta-tato nei preparati. Carattere fondamentale della c-mitosi in questi espe-rimenti risulta essere la mancata divisione del centromero e la distruzio-ne cellulare (citoclasia), fenomeni già noti per gli animali (LEHMANN, 1947).

Concentrazioni 0,4% e 1%: La dose di colchicina allo 0,4% ha una azione molto simile a quella dello 0,2%. L'aspetto delle figure mitotiche è uguale, salvo un anticipo nella degenerazione cellulare e nella picnosi nucleare.

Nuovi fatti tossici compaiono invece nei trattamenti con la concen-trazione all'1%. Durante le prime tre ore di trattamento, si repertano mitosi arrestate alla metafase con c-paia fin dall'inizio contratte oltre misura. L'evoluzione della c-metafase conduce alla picnosi in maniera brusca, direi violenta. Assenza di anafasi e telofasi, come nel caso pre-cedente.

In tempi successivi (4^h, 8^h, 24^h, 48^h) viene a manifestarsi nei prepa-rati la scomparsa completa dello stadio di profase, come conseguenza di una azione sul nucleo quiescente (inibizione pre-profasica). Le c-meta-fasi che si incontrano a breve distanza dall'inizio del trattamento deri-vano dalle profasi in atto. Esaurite tali profasi e degeneratisi in breve tempo i nuclei c-metafasici, la lettura dei preparati denuncia la scom-parsa della moltiplicazione cellulare mitotica a differenza di quanto avviene invece negli animali trattati con dosi meno concentrate. Tali condizioni di *vuoto mitotico* permangono per tutto il periodo di 72 ore dall'inizio del trattamento e fino alla morte dell'animale.

Concentrazioni 0,1% e 0,05%: Le concentrazioni più diluite esert
tano una azione più attenuata sulle cellule in mitosi. Nelle proporzic
dello 0,1% nelle prime ore del trattamento si ha ancora arresto della m
tafase in alcune cellule mentre in altre è ben evidente una azione
semplice disturbo del fuso. Insieme a queste figure cariocinetiche si tr
vano però anche mitosi che si presentano perfettamente normali in tu
i loro stadi. Le c-mitosi comunque sembrano degenerare nel modo cc
sueto dato che si trovano qua e là, successivamente, nuclei picnotici
fasi intermedie di degenerazione nucleare. Non si notano neppure sta
che facciano pensare ad una evoluzione delle c-metafasi.

Più difficile invece è stabilire il destino delle mitosi anomale c
fusi parzialmente inattivati e tripolari data la loro scarsa frequenza e
difficoltà di un loro perfetto riconoscimento. Comunque la presenza qu
e là di micronuclei nel tessuto, penso sia da attribuirsi a tali mitosi irr
golari che in alcuni casi sembrano progredire ed arrivare all'intercines
Dalla attenta lettura dei preparati non credo si possano invece amme
tere fenomeni di restituzione nucleare.

Comunque è da tener presente il fatto che i reperti qui descritti
riferiscono alle prime 4-8^{h} del trattamento. L'azione della colchicina a
pare attenuarsi nei periodi successivi e attraverso passaggi graduali
semplice disturbo fusale si ritorna alle condizioni normali.

La dose allo 0,05 di colchicina non appare avere alcuna azione mo
fologicamente rilevabile sulla cellula in mitosi. Nei preparati, infatt
dopo il trattamento, si trovano tutte le figure cariocinetiche normali c
me nei controlli, salvo forse disturbi del fuso poco o non rilevabili. S
pensiamo che con tali dosi viene introdotta nell'organismo dell'inset
una quantità assoluta di colchicina pari a mgr. 0,000718, si può co
prendere come questa, diluendosi ulteriormente nell'emolinfa di tutto
corpo, agisca in modo estremamente debole sulle varie cellule in mo
tiplicazione, ammesso che essa permanga inalterata per un certo temp
sufficientemente utile per una azione sui tessuti.

Da questa serie di esperimenti sull'azione della colchicina negli En
biotteri, possiamo trarre le seguenti conclusioni:

1) La colchicina iniettata nella cavità emocelica dell'insetto espl
ca una normale azione di arresto delle mitosi alla metafase.

2) Si ottiene successivamente un accumulo di c-metafasi, fenomen
questo molto utile per il riconoscimento della costituzione cariologica

un sempre maggior numero di cellule. L'impiego di tale metodo a scopi di diagnosi cariologica può essere suscettibile di applicazione anche per altri tessuti e per altri stadi di sviluppo dell'animale.

3) Le condizioni di metafase arrestata permangono molto a lungo e vengono seguite da degenerazione nucleare per agglutinazione dei cromosomi e picnosi. Non si hanno fenomeni di ripresa e induzione della poliploidia. Vengono così riconfermati i risultati delle ricerche di Lehmann e altri secondo cui negli animali la colchicina, più che avere una azione statmocinetica riferibile ad una inattivazione del fuso mitotico, sia da considerarsi un agente citoclasico. I cromatidi appaiati non si separano di norma dal centromero per cui alla c-metafase non segue una c-anafase ed una c-telofase.

4) I fenomeni descritti si riferiscono ad una dose iniettata di mm. cubi 1,4360 di soluzione allo 0,2% di colchicina. A concentrazioni superiori (1%) da considerarsi altamente tossiche, si ha inibizione completa anche della profase per cui, dopo l'esaurimento delle mitosi preesistenti al trattamento, si viene a costituire nel tessuto il vuoto mitotico.

A concentrazioni più diluite invece (0,1%) la colchicina esercita una azione più attenuata.

BIBLIOGRAFIA

Barber H. and Callan H., 1943. — *The effects of cold and colchicine on mitosis in the newt.* Proc. Royal Soc. London B, **131**: 258-71.

Barigozzi C., 1942. — *L'azione della colchicina sulla morfologia e sulla struttura dei cromosomi, studiata nelle cellule somatiche di Artemia salina Leach.* Chromosoma, **2**: 293-307.

—, 1942. — *L'azione della colchicina sul Nauplius di Artemia salina Leach.* Monit. Zool. It., **52**: 69-74.

Beatty R. A., 1951. — *Heteroploidy in mammals.* Anim. Bredd. Abst., **19**: 283-292.

Beatty R. A. and Fishberg M., 1952. — *Heteroploidy in mammals. III. Induction of tetraploidy in pre-implantation mouse eggs.* Journ. Genet., **50**: 47-79.

Braungart D. and Ott G., 1942. — *A cytological study of the effect of colchicine on Drosophila melanogaster.* Journ. Hered., **33**: 163-165.

Comandon J. et De Fonbrune P., 1942. — *Action de la colchicine sur Amoeba sphaeronucleus.* C. R. Soc. Biol. Paris., **136**: 410-11, 423, 460-61, 746-47, 747-48.

D'Amato F., 1948. — *The effect of colchicine and ethylene glycol on sticky chromosomes in Allium cepa.* Hereditas, **34**: 83-103.

D'Amato F., 1954. — *Considerazioni sulla inibizione selettiva dei vari stadi nella mitosi* Giorn. It. Chemioterapia, **1**: 129-134.

—, 1959. — *Colchicino-mitosi e poliploidia sperimentale nei vegetali.* Genetica Agraria **11**: (Estratto).

Eigsti O. J. and Dustin P., 1957. — *Colchicine.* Iowa State College Press.

Fankhauser G., 1942. — *Induction of polyploidy in animals by extremes of temperature* Biol. Symp., **6**: 21-35.

Gelei G. and Csik L., 1939. — *A colchicin hatasa a Drosophila melanogaster.* Magyar Biol. Inst. Muukai, **11**: 50-63.

Häggqvist G., 1948. — *Polyploidy in frogs induced by colchicine.* Proc. Kon. Nederl. Akad. Wetensch., **51**: 3-12.

—, 1951. — *Induktion triploider Schweine durch Kolchizin.* Verh. Anat. Ges., **49**: 62-67

Highbee E., 1942. — *Effects of colchicine experiments on chicken.* Anat. Rec., **84**: 483

Hirobe T., 1939. — *Polyploid silkworm induced by colchicine treatment upon eggs.* Jap. Journ. Genet., **15**: 69-74.

Inoba F., 1940. — *Impaternate females of the parasitic wasp Habrobrachon, produced by colchicine treatment.* Proc. Imp. Acad. Tokyo, **16**: 11-13.

Lehmann F., 1946. — *Über die entwicklungsphysiologische Wirkung des Colchizins* Arch. Jul. Klaus-Stift, **21**: 304-307.

Lehmann F. und Hadorn H., 1946. — *Vergleichende Wirkungsanalyse von zwei antimitotischen Stoffen, Colchicin und Benzochinon, am Tubifex-Ei.* Helv. Physiol. et Pharm. Acta, **4**: 11-42.

Lüscher M., 1946. — *Die Entstehung polyploider Zellen durch Colchicinbehandlung im Schwanz der Xenopus-Larve.* Arch. Julius Klaus-Stift, **21**: 303-305.

Peters J., 1946. — *A cytological study of mitosis in the cornea of Triturus viridescens during recovery after colchicine treatment.* Journ. Exp. Zool., **103**: 33-56.

Schreiber G. e Pellegrino J., 1951. — *Análise citológica e cariométrica da acao da colchicina sôbre a espermatogênese dos hemipteros.* Mem. Inst. Oswaldo Cruz, **49**: 513-42

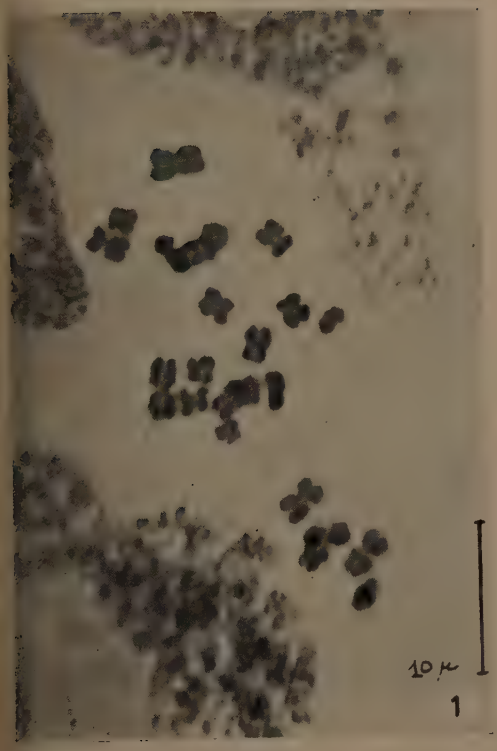
Sokolov I., 1939. — *Einfluss des Colchicins auf die Spermatogonialmitosen bei den Orthopteren.* C. R. Dokl. Acad. Sci. URSS, **24**: 298-300.

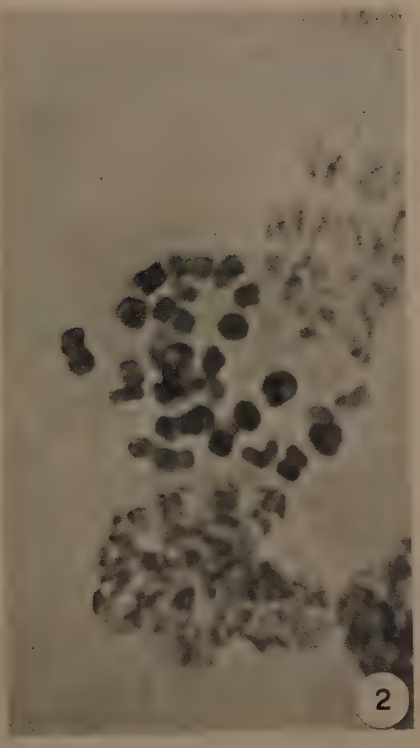
Stefani R., 1955. — *Divisioni amitotiche e modificazioni durante l'oogenesi nell'ovario degli Embiotteri.* Boll. Zool., **22**: 79-91.

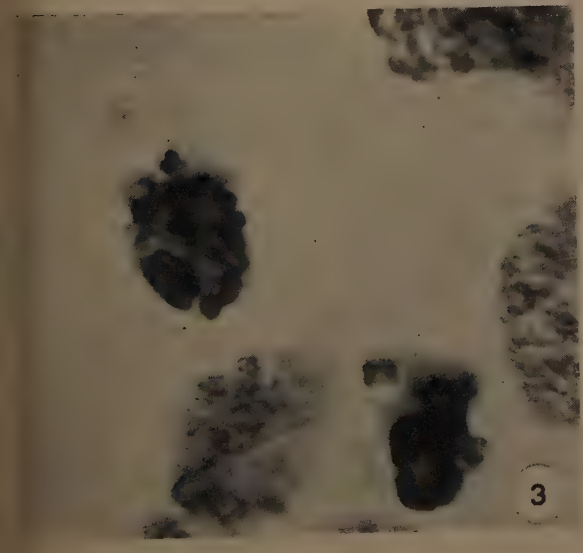
—, 1956. — *Il problema della partenogenesi in Haploembia solieri Ramb.* Acc. Naz. Linc. Mem., V Sez., **3**: 127-201.

SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA LXIV

Fig. 1 — Metafase da colchicina in cellula dell'epitelio follicolare ovarico di Haploembia solieri partenogenetica (biotipo diploide tetrasomico). Orceina Acetica. Preparato per schiacciamento.







Renzo Stefani — L'azione della colchicina sulle cellule dell'epitelio follicolare ovarico degli Embiotteri.

Fig. 2 — Id. Stadio più tardivo con fenomeni di agglutinazione tra i cromatidi di alcune paia. H. solieri part. (biotipo triploide tetrasomico). Ingrandimento come nella fig. prec. Orc. acet. Schiacc.

Fig. 3 — Stadio successivo al precedente. Agglutinazione intensa tra le paia ed inizio della picnosi. Ingr. e colorazione c. s.

Fig. 4 — Stadio successivo al precedente. Picnosi nucleare. Ingrand. e coloraz. come nei precedenti prep.

SUMMARY

Colchicine, in aqueous solution, injected in fixed quantities and at variable concentrations, has been tested on the follicular epithelium of Embioptera. With a proper concentration (0.2%) of colchicine, a typical metaphasic arrest is induced after 30 minutes.

The c-pairs are scattered over the cell (unoriented metaphase) but division of the centromeres does not take place. No process leading to interphase nor recovery is present. Accumulation of arrested metaphases is followed by stickiness of the c-pairs and nuclear degeneration after picnosis.

Induced polyploidy has not been found. Stronger concentrations (1%) inhibit prophases and lead to a total disappearance of mitosis.

Application of lower dosages (0.1%) causes only disturbances of the spindle, so that colchicine, at concentrations of 0.2% (dose of solution: mgr. 1.4360) is to be considered one of the best tools for the caryological study in Embioptera.

RIASSUNTO

Il presente lavoro rappresenta un primo saggio dell'azione della colchicina sugli Embiotteri. L'alcaloide, iniettato nella cavità del corpo in soluzione acquosa e in quantità costanti a varie concentrazioni, svolge, nella concentrazione del 0,2% un'azione statmocinetica ottimale e tipica sulle mitosi dell'epitelio follicolare ovarico, scelto come test istologico. Si viene a determinare successivamente un tipico fenomeno di accumulo delle c-metafasi cui segue degenerazione nucleare per agglutinazione dei cromosomi e picnosi. Non esistono fenomeni di ripresa e di induzione della poliploidia. Concentrazioni superiori, decisamente tossiche, inibiscono completamente la cariocinesi, determinando il vuoto mitotico mentre concentrazioni meno elevate esercitano solamente una azione di disturbo del fuso.

MEIOTIC ABNORMALITIES AND FAILURE OF SPINDLE MECHANISM IN *SUAEDA FRUTICOSA* FORSK.

by

C. P. MALIK (1) and S. L. TANDON (2)

University of Delhi, Delhi, India.

(with Plate LXV-LXVI)

Received: 30th December 19

MALIK (1958) reported the existence of a natural polyploid seri with $n = 9$, 18 and 27 in *Suaeda fruticosa* Forsk. MALIK and TANDO (1959*a*) have briefly described partial failure of meiotic spindle in morphological variant ($n = 9$) of the species. The present paper concer the details of meiotic abnormalities and their relationship with spind mechanism in the same plant.

MATERIALS and METHODS

The flower buds of *Suaeda fruticosa* were fixed in Carnoy's fixati (6 : 3 : 1) for 24 hours. The fixed material was squashed in acetocarmin to which a few drops of ferric acetate had been added. All figures ha been drawn at an uniform magnification of 1420. These have been redu ed to half in publication.

OBSERVATIONS

Nine bivalents were counted at metaphase I in plants with norm meiotic division (Fig. 1). The bivalents were arranged in the equatori plane and showed 9/9 separation at anaphase I (Fig. 10). The secon division which was quite regular resulted in the formation of norm tetrads (Fig. 49).

In the morphological variant exhibiting abnormal meiosis, near

(1) Lecturer in Botany, Deshbandhu College, New Delhi-19, India.

(2) Reader in Botany, University of Delhi, Delhi-8, India.

per cent of the cells showed normal division. These cells were seen occur side by side with the abnormal ones. Although majority of e cells in the variant showed 9 bivalents, cells with 7 bivalents and 4 ivalents, 8 bivalents and 2 univalents, 6 bivalents and 6 univalents, d 5 bivalents and 8 univalents (Fig. 2) were also encountered. The esence of univalents at metaphase I was possibly due to early disjunc- on of bivalents as normal pairing of chromosomes was observed during ophase I. The bivalents at metaphase I did not organise themselves at e equatorial plate but were scattered singly or in groups of varying

TABLE I

Number of groups	Number of bivalents in each group at metaphase I	Number of cells
1	9	6
2	8+1	1
»	7+2	1
»	6+3	1
»	5+4	2
3	7+1+1	2
»	6+2+1	1
»	5+3+1	1
»	5+2+2	1
»	4+3+2	1
»	4+4+1	1
4	4+3+1+1	3
»	5+2+1+1	2
5	2+2+2+2+1	2

umbers (Figs. 3-7; Table I). This type of abnormal behaviour in the istribution of bivalents may be attributed to the lack of directive in- uence of the spindle. The excessive contraction of bivalents (Fig. 8) hich could also be due to the improper functioning of the spindle was oticed in a few cells. Figure 9 shows that all the bivalents excepting one ave disjuncted. The anaphase I was abnormal with 18 univalents distri- uted irregularly in variable groups (Figs. 11-22; Table II). In some ollen mother cells all the bivalents had divided but these constituted nly one group (Figs. 11 and 12). The stage is comparable to anaphase I. his condition could only result due to the complete failure of spindle

mechanism. The presence of cells having chromosomes in more th two groups at anaphase I (Figs. 18-21) may be explained by assumi that the divided chromosomes have remained in the same position they were at metaphase I. The arrangement of chromosomes as s in figures 19-21 excludes the possibility of the formation of a multipo spindle which could also cause the chromosomes to be present in m than two groups. The presence of chromosomes in two groups in s

TABLE II

Number of groups	Number of univalents in each group at anaphase I	Number of cells
1	18	6
2	17+1	4
»	16+2	1
»	14+4	3
»	12+6	1
»	11+7	1
»	10+8	3
»	9+9	4
3	10+4+4	1
»	9+8+1	1
»	9+7+2	1
»	9+5+4	1
»	8+8+2	1
»	8+6+4	1
4	8+6+2+2	1
»	8+4+4+2	1
»	6+4+4+4	1
7	8+3+2+2+1+1+1	1
8	5+4+3+2+1+1+1+1	1

cells (Figs. 10, 14, 15) apparently shows that the spindle mechanism operative in these cases. The division of chromosomes of the cell dra in figure 5 could, however, lead to a situation as observed in figure even without the operation of spindle mechanism. Figures 23-30 exhi variation in the size and number of nuclei at telophase I. Figure which shows a single large nucleus possibly represents the subsequ stage of the metaphase I and anaphase I as drawn in figures 3 and respectively. This, of course, would mean that the spindle has not b operative. In some cells the division of one of the bivalents was delay

univalents constituted a single nucleus in this case (Fig. 24). The rmation of the two nuclei at telophase I normally indicates the fun- ioning of the spindle. The existence of more than two nuclei at lophase I may be due to the presence of univalents in more than two roups as was observed at anaphase I. The variation in the size of

TABLE III

Number of groups	Number of chromatids in each group at anaphase II	Number of cells
1	36	4
2	35+1	1
»	34+2	2
»	32+4	2
»	28+8	2
»	26+10	1
»	22+14	3
»	20+16	1
»	18+18	1
3	18+16+2	1
»	18+14+4	1
»	16+16+4	2
»	16+12+8	1
»	20+8+8	1
4	16+12+4+4	1
»	16+8+8+4	2
»	12+8+8+8	2
»	10+10+10+6	1
7	16+6+4+4+2+2+2	1
8	10+8+6+4+2+2+2+2	1

nuclei (Fig. 28) may be ascribed to the numerical differences of the chromosomes constituting the nuclei.

Anaphase II resulted in the formation of 36 chromatids per pollen nother cell. The chromatids were distributed in variable groups (Figs. 31-39; Table III). The maximum number of groups in a cell was eight, the minimum number of chromatids comprising a group being two (Fig. 39). The minimum number of groups in a cell was one and this contained all the 36 chromatids (Fig. 33). The cell with 36 chromatids possibly represents the subsequent stage corresponding to cells drawn in figures 3, 12, and 23. This further indirectly supports that the spindle

has not been functioning. The existence of cells with chromosomes p sent in less than four groups or more than four groups at anaphase may also indicate a complete or partial failure of spindle especia when these cases are considered in the light of the distribution of ch mosomes in the previous stages. Figures 40-49 depict telophase II sh ing variation in the size and number of nuclei. It will be seen th some chromatids have not organised themselves into nuclei (Figs. 41-4 That the size of the nucleus is dependent upon the number of chrom tids which constitute it can be easily made out by comparing figures 42 and 43 with each other. Of the three, the largest nucleus (Fig. 41) made up of 32 chromatids whereas the smallest (Fig. 43) is constitu by 16 chromatids only. At the late telophase II, monads, dyads, tria (Fig. 46), tetrads and pentads (Fig. 48) were formed. The occurren of monads indicates complete failure of the spindle. The pollen gra produced by the plant were of variable sizes.

Discussion

Since the variant is at a diploid level, obviously factors other th polyploidy are responsible for the meiotic abnormalities. The fact th the chromosomes at metaphase I did not organise themselves at t equatorial plate and that these were scattered in groups of varyi numbers may indicate failure of the spindle mechanism. Further, t existence of cells with chromosomes present in one or two groups duri anaphase II may also show complete or partial failure of spindle es cially when these observations are considered in the light of previo stages. The occurrence of monads at the end of the division could a possibly be due to the complete failure of the spindle. Although direct observations on spindle were made, the over-all picture of t meiotic irregularities shows complete or partial failure of spindle m chanism. It may, however, be mentioned here that the existence of ce with regular distribution of chromosomes at anaphase I and formati of tetrads at the end of division indicates that normal spindle mec nism operates in some cases.

Khoshoo (1957) reported a case of partial failure of spindle duri both divisions of meiosis in pollen mother cells of *Cephalotaxus drupa* var. *pedunculata*. Since normal and abnormal trees grew side by s it was concluded that the cause of the abnormality is genic rather th environmental. While studying spindle abnormalities and variation

chromosome number in *Ribes nigrum*, VAARAMA (1949) also reported that the spindle mechanism is under genic control. The buds of *Suaeda fruticosa* collected during the normal flowering season in May-October (35-38 C) did not show any meiotic disturbances. The abnormalities described in the present communication were from those buds which appeared late in the season during January-February when there is a sudden fall in temperature (17-18 C). This sharp decline in temperature may have caused the meiotic abnormalities. Meiotic irregularities due to variation in temperature have also been recorded in other plants (SAX, 1937; MATSUURA and HAGA, 1940; GUSTAFSSON and NYGREN, 1946; RAMAN and KRISHNASWAMI, 1959; MALIK and TANDON, 1959*b*).

REFERENCES

GUSTAFSSON A. and NYGREN A., 1946. — *The temperature effect on pollen formation and meiosis in Hieracium robustum*. Hereditas, **32**: 1-14.

KHOSHOO T. N., 1957. — *Cytology of Conifers III. Partial failure of meiotic spindle in Cephalotaxus drupacea var. pedunculata*. Cytologia, **22**: 80-89.

MALIK C. P., 1958. — Part of the thesis submitted to Panjab University, India, for Master's degree in Science.

MALIK C. P. and TANDON S. L., 1959*a*. — *Partial failure of meiotic spindle in Suaeda fruticosa Forsk*. Jour. Sci. and Industr. Res., **18** C: 233-234.

—, 1959*b*. — *Cytological behaviour of Asparagus curillus Ham. in relation to different environments*. Indian Jour. Hort., **16**: 39-41.

MATSUURA H. and HAGA T., 1940. — *Chromosome studies on Trillium kamtschaticum Pall VIII. On the mitosis-meiosis relationship*. Cytologia, **10**: 382-389.

RAMAN V. S. and KRISHNASWAMI D., 1959. — *Aberrant division of the meiotic chromosomes in Sorghum halepense Pers*. Jour. Indian Bot. Soc., **38**: 296-298.

SAX K., 1937. — *Effect of variations in temperature on nuclear and cell division in Tradescantia*. Amer. Jour. Bot., **24**: 218-225.

VAARAMA A., 1949. — *Spindle abnormalities and variation in chromosome number in Ribes nigrum*. Hereditas, **35**: 136-162.

EXPLANATION OF PLATES LXV-LXVI

PLATE LXV

Figs. 1-8. Metaphase I. — Fig. 1. Normal with 9 bivalents. — Fig. 2. Five bivalents and 8 univalents. — Fig. 3. All the bivalents in this case would form a single nucleus. — Figs. 4-7. Irregular distribution of bivalents. — Fig. 8. Excessive contraction of the bivalents. — Figs. 9-22. Anaphase I with regular and irregular distribution of univalents

in variable groups. — Figs. 23-25. Abnormal telophase I. — Fig. 23. All the 18 univalent constituting a single nucleus. — Figs. 24-25. A single telophasic nucleus along with a bivalent (Fig. 24) or an univalent (Fig. 25). All figures × 710.

PLATE LXVI

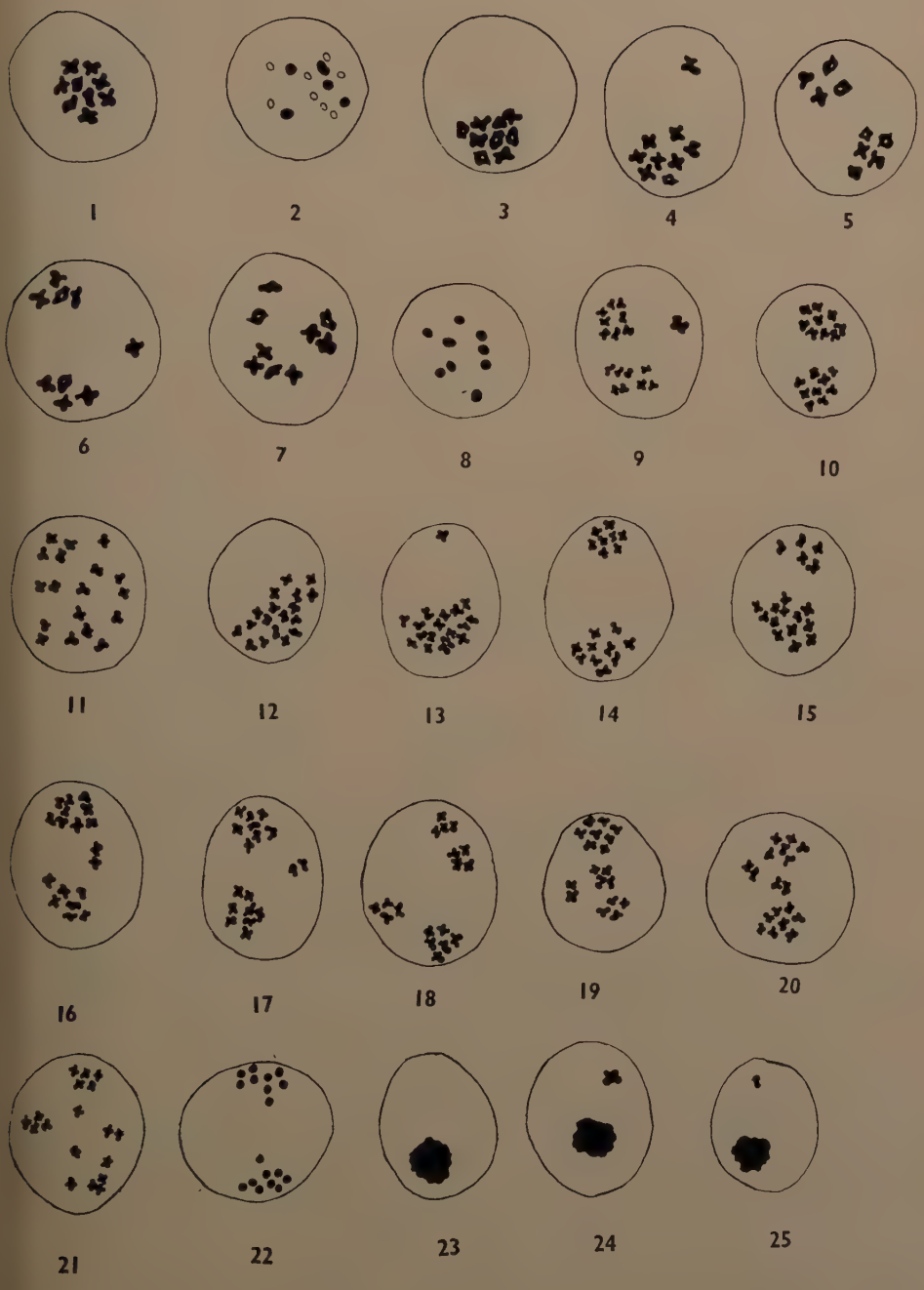
Figs. 26-28. Variation in the size and number of nuclei at telophase I. — Figs. 29-30. A single telophasic I nucleus along with 2 bivalents and 2 univalents (Fig. 29) or 14 univalents in two groups of 8 and 4 (Fig. 30). — Figs. 31-39. Anaphase II with 36 chromatids distributed in variable groups. — Figs. 40-49. Telophase II showing variation in the size and number of nuclei. Some chromatids have not organised themselves into nuclei (Figs. 41-45). All figures × 710.

SUMMARY

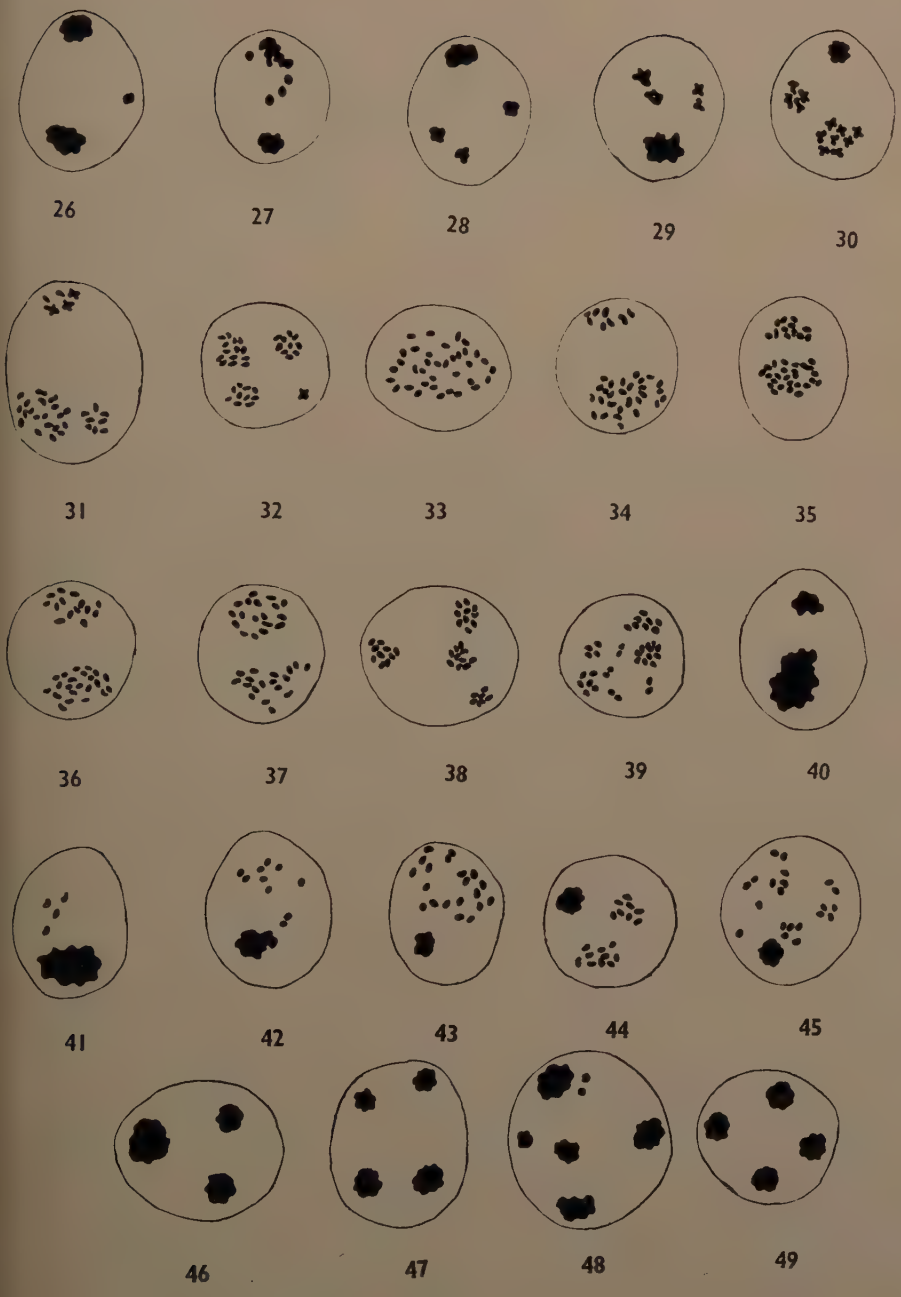
The paper describes meiotic abnormalities and their relationship with spindle mechanism in a morphological variant of *Suaeda fruticosa* Forsk. with $n = 9$. The chromosomes at metaphase I did not organise themselves at the equatorial region and were seen to lie scattered in groups of varying numbers. Pollen mother cells with chromosomes in one or two groups during anaphase II were also encountered. The over-all picture of the meiotic irregularities indicates complete or partial failure of spindle mechanism. As the abnormalities were from those buds which appeared late in the season during January-February (17-18° C), it has been suggested that these may have been caused by a sharp fall in temperature during this period. Buds studied during the normal flowering season in May-October (35-38° C) did not exhibit any such meiotic irregularity.

RIASSUNTO

L'Autore descrive anormalità meiotiche e loro rapporti con il meccanismo del fuso in una varietà morfologica di *Suaeda fruticosa* Forsk. con $n = 9$. I cromosomi alla metafase non si ordinavano nella regione equatoriale ma erano sempre sparsi in gruppi di numero variabile. Furono anche osservate cellule madri del polline con cromosomi disposti in uno o due gruppi durante l'anafase della seconda divisione. Gli aspetti delle irregolarità meiotiche sopradescritti indicano una completa o parziale mancanza del meccanismo fusale. Siccome le anormalità provenivano dai bocci che apparvero tardivamente nella stagione, durante il gennaio e il febbraio (17-18 C°), si è supposto che esse possono essere dipese da una forte caduta di temperatura durante questo periodo. I bocci studiati durante la stagione della normale fioritura, da maggio a ottobre (35-38 C°) non mostrarono tali irregolarità.



C. P. Malik and S. L. Tandon — Meiotic abnormalities and failure of spindle mechanism in *Suaeda fruticosa* Forsk.



C. P. MALIK and S. L. TANDON — Meiotic abnormalities and failure of spindle mechanism in *Suaeda fruticosa* Forsk.

FLORIDO SALVI

ANALISI DELLA VARIABILITÀ GENETICA DEL PESO VIVO ALLE ETÀ DI SEI E DODICI MESI NEI VITELLI DI RAZZA CHIANINA

(con 3 figure nel testo) *

In redazione: il 12 gennaio 1960.

PREMESSA

Alla base del processo ereditario dei caratteri quantitativi sta la attitudine o capacità del genotipo a variare entro un determinato ambito definito dalla variabilità ambientale.

Questa « norma di reazione » (KHUN) dell'idiotipo a stimoli ambientali costituisce il momento fondamentale a cui si appoggiano i moderni concetti della Genetica delle popolazioni.

Ogni manifestazione fenotipica di un determinato carattere oltrechè dipendere dalla variazione genetica deriva altresì dalla variazione ambientale e dalla interazione fra patrimonio ereditario e ambiente.

Una analisi particolareggiata delle varie componenti che partecipano alla manifestazione fenotipica di un carattere poligenico, può essere sinotticamente rappresentata dallo schema della Fig. 1 (da SCOSSIROLI, 1955).

Osservando la figura 1 possiamo con facilità vedere come il fenotipo, indicato con il simbolo P possa considerarsi la risultante di tre componenti principali:

Ge = componente genetica;
E = componente ambientale;
f(Ge,E) specificante l'interazione fra genotipo ed ambiente.

A sua volta la componente genotipica si scinde in due frazioni: una

* Università degli Studi di Catania, Facoltà di Agraria, Istituto di Zootecnica generale (Dir. Prof. P. G. BUIATTI). Ministero dell'Agricoltura e delle Foreste, Ispettorato Agrario Compartimentale per la Toscana, Commissione Tecnica Direttiva L. G. Razza Chianina, Ufficio Centrale di Firenze.

frazione legata alla condizione di omozigosi, fissabile ereditariamentt data dalla porzione additiva G; ed una frazione non additiva G′ dipe dente dalla condizione di eterozigosi dei genî e rappresentante le devi zioni dallo schema additivo, dovute a dominanza ed epistasi.

Entrambe le frazioni G e G′ essendo il risultato della segregazio mendeliana derivano a loro volta dal contributo paterno G_S, matern G^D e da un contributo casuale G_C fra loro interagenti.

L'interazione fra i tre predetti contributi viene indicata in figu mediante la notazione:

$$f\,(G_S,\ G_D,\ G_C)$$

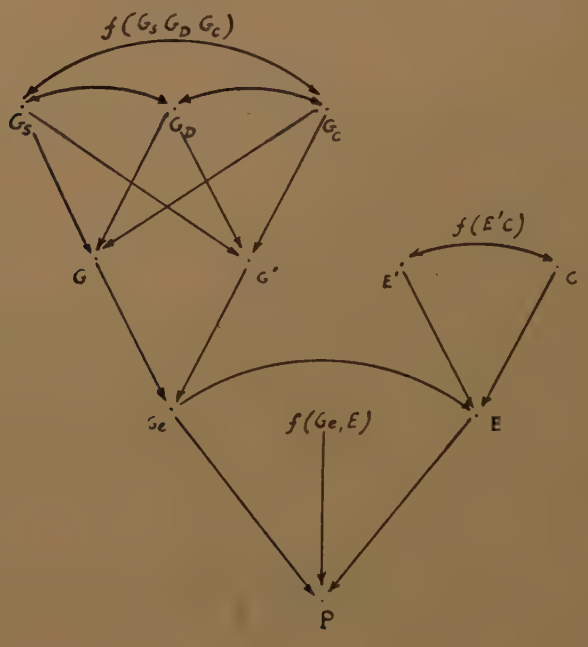


Fig. 1

Parimenti a quanto abbiamo già visto per la componente genetica anche quella ambientale si può considerare costituita da due contributi una componente ambientale di origine casuale E′ ed una componente ambientale di natura sistematica C, anch'esse fra loro interagenti.

Per potere valutare l'importanza delle varie cause determinanti l differenze di un carattere quantitativo, queste ultime vengono statisti camente espresse in termini di varianza; pertanto, per quanto abbiam

in precedenza accennato, la variabilità fenotipica può essere rappresentata dalla relazione seguente :

$$\sigma_P^2 = \sigma_{Ge}^2 + \sigma_E^2 + 2r_{Ge\,E}\,\sigma_{Ge}\,\sigma_E + f(Ge, E) \qquad (1)$$

Quando l'analisi genetica si propone scopi eminentemente pratici e la componente ambientale si considera costituita esclusivamente dalla sua frazione casuale E′, gli ultimi due termini della precedente equazione possono essere trascurati. Avremo pertanto che la (1) può, in tal caso, ricondursi alla forma assai semplificata :

$$\sigma_P^2 = \sigma_{Ge}^2 + \sigma_E^2 \qquad (1')$$

La frazione della varianza fenotipica considerata pari all'unità dovuta a differenze genetiche, dicesi ereditabilità e si indica con h^2.

In base al simbolismo adottato avremo quindi :

$$h^2 = \frac{\sigma_{Ge}^2}{\sigma_P^2} \qquad (1'')$$

In termini biometrici h^2 stabilisce la correlazione fra genotipo e fenotipo e secondo Lerner (1949), definisce ancora il grado di precisione con il quale è possibile stimare il genotipo in base al fenotipo.

Giova qui osservare con Lush (1954), che il significato che possiamo attribuire alla stima del valore di h^2 per un determinato carattere è duplice, in quanto la frazione della varianza fenotipica imputabile alle differenze tra i genotipi degli individui può considerarsi in senso ristretto ed in senso lato.

In senso lato l'ereditabilità riguardando l'intero genotipo comprende oltrechè gli effetti medî dei genî ad azione additiva interessati alla manifestazione del carattere, anche le interazioni geniche, non necessariamente lineari, specificanti le deviazioni dovute a dominanza ed epistasi.

Abbiamo infatti già visto, come la componente genotipica comprenda una frazione legata alla condizione di omozigosi G, ed una frazione indicata con G′, rappresentante le deviazioni dallo schema additivo (1). Tali

(1) Anche K. Mather, sulla base degli studi compiuti da Fisher (1918) e da Fisher, Immer e Tedin (1932) elaborando uno schema di analisi della variabilità continua dei caratteri poligenici, perviene alla definizione, nella variabilità fenotipica, di componenti genetiche ed ambientali. Secondo Mather infatti, la varianza fenotipica d'una generazione biparentale F_3, derivata da incroci casuali di tutti i possibili genotipi dell'F_2, viene riconosciuta pari a : $\frac{1}{2}D + \frac{1}{4}H + E$ ove appunto D e H assumono il significato già specificato per G e G′.

deviazioni, in quanto dovute alla condizione di eterozigosi e quindi non fissabili ereditariamente, rappresentano in realtà le differenze tra l'effetto dei genî interessati in ogni effettiva combinazione genotipica e il loro effetto medio nell'intera popolazione.

È facilmente comprensibile che sotto tale aspetto la ereditabilità viene usata esclusivamente allo scopo di distinguere le influenze ereditarie da quelle ambientali.

Nel senso più limitato invece, l'ereditabilità definisce esclusivamente gli effetti medî dei genî e trascurando le interazioni intra ed interalle

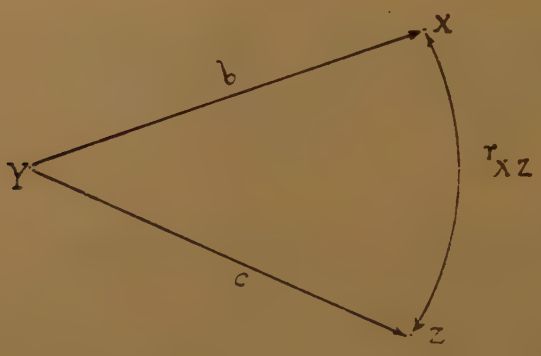


Fig. 2

liche rappresenta pertanto la frazione delle differenze fenotipiche tra genitori che si può prevedere venga fissata nella progenie.

Ne deriva che dal punto di vista pratico, l'ereditabilità in senso ristretto, costituisce com'è intuitivo, il più importante parametro di una popolazione sottoposta a selezione in quanto permette, stabilita una particolare pressione selettiva di prevedere l'incremento realizzabile nella discendenza.

Poichè nel presente lavoro, l'interpretazione delle diverse componenti derivate dalla scomposizione della variabilità fenotipica, viene condotta mediante le relazioni che intercorrono tra fratellastri (sorellastre) in base alla analisi proposta da LERNER e LUSH col metodo dei «path coefficients» di S. WRIGHT (1931), prenderemo in esame il momento fondamentale per l'interpretazione suddetta, valutando l'ammontare di tale relazione.

Si prenda all'uopo in esame lo schema causa-effetto della Fig. 2 (2) : in cui X e Z rappresentano le variabili causali comuni della variabile Y che rappresenta l'effetto dell'azione congiunta e concomitante di X e Z.

Nella figura i path da Y ad entrambe le variabili causali vengono indicati mediante frecce ad una sola testa, mentre la freccia a doppia testa indica la correlazione esistente tra X e Z simboleggiata con r_{xz}.

Come risulta dallo schema, la variabile Y può essere stimata in termini di equazione di regressione multipla giusto la relazione seguente :

$$Y = A + B(X - \bar{X}) + C(Z - \bar{Z}) \qquad (2)$$

ove per la determinazione dei parametri A, B e C basta risolvere un sistema di equazioni normali della forma :

$$\begin{aligned} \Sigma Y &= AN + B\Sigma X + C\Sigma Z \\ \Sigma YX &= A\Sigma X + B\Sigma X^2 + C\Sigma ZX \\ \Sigma YZ &= A\Sigma Z + B\Sigma XZ + C\Sigma Z^2 \end{aligned}$$

Esprimendo le variazioni di Y in termini di deviazioni standard la (2) diventa :

$$\frac{Y - \bar{Y}}{\sigma_Y} = \frac{B\sigma_X}{\sigma_Y}\left(\frac{X - \bar{X}}{\sigma_X}\right) + \frac{C\sigma_Z}{\sigma_Y}\left(\frac{Z - \bar{Z}}{\sigma_Z}\right) \qquad (2')$$

e ponendo : $b = \frac{B\sigma_X}{\sigma_Y}$; $c = \frac{C\sigma_Z}{\sigma_Y}$; $x = \frac{X - \bar{X}}{\sigma_X}$; $y = \frac{Y - \bar{Y}}{\sigma_Y}$

$z = \frac{Z - \bar{Z}}{\sigma_Z}$; avremo ancora :

$$y = bx + cz.$$

Ove i parametri b e c specificanti la frazione di deviazione standard di Y dovuta rispettivamente alle variazioni delle variabili causali X e Z rappresentano i « path coefficients » già menzionati.

Poichè la somma degli scarti dalla media è nulla, la varianza dei termini standardizzati è pari all'unità ed infine essendo : $cov(xz) = r_{xz}$, il sistema precedentemente impostato diventa :

$$\begin{cases} r_{YX} = b + cr_{XZ} \\ r_{YZ} = br_{XZ} + c \end{cases}$$

---

(2) R. E. Scossiroli, *Il metodo statistico nella Genetica*. Corso di metodologia statistica per ricercatori. Università di Roma, 1959.

C. C. Li, *The concept of path coefficients and its impact on population genetics*. Biometrics, *12:* 2, 1956.

Nell'ipotesi in cui non vi sia correlazione tra X e Z essendo nullo il valore di r_{xz} avremo che i «path coefficients» da Y a Z e da Y a X sono rappresentati semplicemente dai coefficienti di correlazione.

Per il teorema della completa determinazione si verifica:

$$b^2 + c^2 + 2bcr_{xz} = 1$$

Se Y rappresenta lo zigote e X, Z rappresentano i gameti dalla cui fusione esso si origina, essendo il primo linearmente, completamente ed ugualmente determinato da entrambi i gameti (3), possiamo facilmente comprendere come i due path dallo zigote ai gameti rappresentino la correlazione esistente tra il contenuto genico dello zigote e quello dei gameti espresso in un determinato valore metrico.

In assenza di «imbreeding» la correlazione tra lo spermio e l'uovo è nulla, pertanto verificandosi che: $b = c = a$; avremo:

$$2a^2 = 1$$

da cui l'importante risultato:

$$a = \sqrt{\frac{1}{2}}$$

Tenendo presente che la correlazione fra gamete e zigote è uguale alla correlazione tra il predetto gamete e lo zigote della generazione precedente, la relazione fenotipica tra i fratellastri può allora rappresentarsi mediante lo schema della Fig. 3 (da LERNER, modificato):

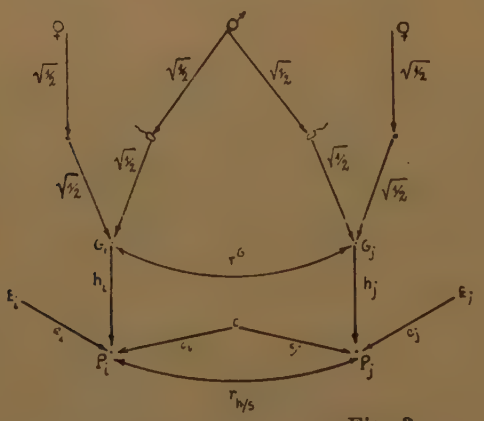


Fig. 3

(3) Ciò vale soltanto allorquando, come avviene nel nostro caso, si considerino esclusivamente gli effetti dei geni autosomici ad azione additiva.

Osservando lo schema risulta che la relazione fenotipica tra i fratellastri indicata in figura con $r_{h/s}$ può essere determinata mediante un path genetico oppure un path ambientale.

Così infatti, se la correlazione tra genotipo e fenotipo viene indicata con h e la relazione genetica tra i genotipi dei fratellastri con r^G, il path genetico che unisce i due fenotipi sarà evidentemente:

$$h_i \; r^G \; h_j$$

poichè per lo stesso carattere $h_i = h_j$ ed $r^G = \left[\left(\frac{1}{2}\right)^{1/2}\right]^4 = \frac{1}{4}$ avremo ancora che la correlazione fenotipica tra i mezzi fratelli stimata mediante il coefficiente di correlazione intraclasse entro il genitore comune è pari ad 1/4 del path genetico, più il path dovuto all'ambiente comune indicato in figura con il simbolo C.

Riassumendo avremo quindi:

$$r_{h/s} = \frac{1}{4} h^2 + c^2$$

In questa correlazione non viene considerata «l'influenza dell'ambiente casuale E' poichè i paths e_i ed e_j contribuiscono ad un ammontare uguale alla rassomiglianza tra individui anche non legati da relazioni parentali» (SCOSSIROLI, op. cit.).

Anche C può essere trascurato per la maggior parte dei caratteri rilevabili negli animali domestici, per cui, omettendo il secondo termine posto al secondo membro della soprascritta equazione, si perviene alla nota relazione:

$$h^2 = 4r_{h/s} \qquad (3)$$

Sulla scorta delle considerazioni precedentemente esposte, abbiamo assunto come schema generale di calcolo il metodo della correlazione intraclasse tra mezzi fratelli entro il riproduttore maschio.

All'uopo siamo partiti dalla classica formula di COCHRAN mediante la quale è possibile calcolare il suddetto coefficiente attraverso una preliminare scomposizione della varianza totale nelle sue componenti dovute alla varianza tra progenie ed entro progenie.

Indicando con mqs_B e mqs_W rispettivamente le varianze tra ed entro le progenie e inoltre, indicando con η il numero medio di figli per ciascun toro, avremo:

$$r_{h/s} = \frac{1 - \frac{mqs_W}{mqs_B}}{1 + (\eta - 1)\frac{mqs_W}{mqs_B}}$$

Sviluppando, eliminando e dividendo entrambi i termini della fr zione per η otteniamo :

$$r_{h/s} = \frac{\frac{mqs_B - mqs_W}{\eta}}{\frac{mqs_B - mqs_W}{\eta} + mqs_W}$$

e se infine si pone :

$$\frac{mqs_B - mqs_W}{\eta} = S; \quad mqs_W = Q$$

avremo che :

$$r_{h/s} = \frac{S}{Q + S}$$

pertanto in base alla (3) risulta :

$$h^2 = \frac{4\,S}{Q + S}$$

Come risulta dalle soprascritte uguaglianze ed in base alla defi zione di ereditabilità, il valore 4S assume il significato di componen media della varianza fenotipica dovuta alle differenze tra i genito comuni ad ogni singola progenie (padre); Q rappresenta l'errore che termini biometrici è dato dalla varianza media delle singole varian di ciascuna progenie.

Poichè sempre conforme alla definizione biometrica di ereditabili la varianza fenotipica viene riconosciuta pari a :

$$\sigma_P^2 = S + Q$$

ne deriva di conseguenza che essendo S uguale ad 1/4 della varianza g netica, la componente dovuta all'errore (Q) deve necessariamente conoscersi uguale alla varianza ambientale più i 3/4 della varian genetica.

Similmente, la componente genetica della covarianza fenotipi viene riconosciuta pari a $4S_{ij}$, onde la correlazione genetica sarà e dentemente data dal rapporto tra la predetta covarianza e la me geometrica delle varianze genetiche dei singoli caratteri.

Materiale

Nel presente lavoro viene studiata la analisi genetica del peso vivo all'età di sei e dodici mesi in un campione di vitelli di razza Chianina, maschi e femmine costituito all'origine da 1092 soggetti ripartiti in 20 progenie facenti capo ad altrettanti tori capinucleo allevati nella Val di Chiana aretina durante il quinquennio 1950-'55.

Per le ragioni che verranno successivamente addotte nel testo la predetta consistenza numerica venne ridotta a capi 996 così ripartiti:

Maschi n. 394; Femmine n. 602

a loro volta rispettivamente suddivisi in 15 e 20 progenie.

Nella acclusa tabella I vengono riportati, unitamente alle elaborazioni biometriche parziali, il numero dei figli di entrambi i sessi facenti capo a ciascun genitore.

Le progenie costituite da fratellastri e da sorellastre (half sibs) furono tutte prelevate, come abbiamo già detto, da aziende della Val di Chiana aretina le quali per condizioni ecologiche edafico-climatiche, possono tutte ricondursi a quelle che sono in media le fondamentali caratteristiche dell'ambiente agrario della zona in parola.

Nella scelta delle aziende fu inoltre particolarmente considerato l'ambiente zootecnico in senso necessariamente lato dando però notevole importanza alla tecnica dell'alimentazione delle singole aziende.

Anche sotto questo particolare aspetto si può in genere ritenere che i criteri seguiti dalle diverse aziende in materia di alimentazione e di tecnica dello svezzamento dei vitelli possono con soddisfacente approssimazione ricondursi alle caratteristiche linee direttrici che informano l'allevamento bovino della Val di Chiana.

Il materiale che forma l'oggetto della ricerca fu fornito e scelto secondo i criterî predetti dall'Ufficio Centrale della Commissione Tecnica Direttiva del L.G. della razza Chianina al cui personale siamo oltremodo grati per le preziose informazioni e la gentile ospitalità.

Calcolo della ereditabilità e della correlazione genetica

Prima di procedere alla scomposizione della varianza totale nella varianza dovuta alle differenze tra le progenie ed entro progenie, ab-

FEMMINE

Toro	N. figlie	6 mesi		12 mesi		Somma pe a 6 e 1
		Somma pesi	Somma quadrati pesi	Somma pesi	Somma quadrati pesi	
1	40	10.026	2.537.006	15.899	6.348.833	4.00
2	5	1.087	239.385	1.717	593.515	37
3	15	3.430	793.134	5.353	1.919.631	1.22
4	13	2.862	641.782	4.722	1.731.930	1.05
5	66	14.930	3.413.388	24.045	8.838.325	5.48
6	29	6.525	1.486.895	10.438	3.781.202	2.36
7	19	4.198	937.190	6.879	2.502.363	1.52
8	63	15.165	3.695.601	23.854	9.114.880	5.79
9	70	15.895	3.646.735	26.615	10.183.711	6.07
10	24	5.976	1.500.612	9.691	3.944.227	2.49
11	13	3.222	808.954	5.086	2.009.856	1.27
12	4	874	191.354	1.444	522.806	31
13	4	981	241.901	1.582	628.230	38
14	7	1.788	457.954	2.805	1.125.691	71
15	60	13.296	2.978.678	22.116	8.196.032	4.93
16	56	14.164	3.619.384	21.995	8.692.759	5.60
17	26	6.239	1.508.675	10.165	3.993.203	2.45
18	5	1.139	261.499	1.844	684.616	42
19	43	10.167	2.426.857	15.658	5.762.318	3.77
20	40	9.399	2.223.665	15.555	6.090.479	3.67
Totale	602	141.363	33.610.649	227.463	86.664.607	53.96

iferite a 20 progenie di tori Chianini.

MASCHI

N. figli	6 mesi		12 mesi		Somma prodotti pesi a 6 e 12 mesi
	Somma pesi	Somma quadrati pesi	Somma pesi	Somma quadrati pesi	
18	5.101	1.464.843	9.574	5.114.666	2.727.806
10	2.643	713.909	4.960	2.486.510	1.330.364
13	3.669	1.046.299	6.489	3.265.827	1.843.326
21	5.907	1.676.155	10.908	5.700.252	3.083.691
50	15.023	4.547.365	27.019	14.663.837	8.195.934
13	3.862	1.151.860	6.879	3.644.867	2.047.792
49	13.376	3.702.528	24.760	12.680.694	6.816.946
27	8.342	2.611.776	15.325	8.765.647	4.763.467
40	12.390	3.886.848	22.902	13.223.272	7.139.887
5	1.291	336.975	2.362	1.120.012	613.335
15	4.425	1.318.371	8.356	4.667.026	2.468.587
70	19.402	5.452.896	36.348	19.020.374	10.177.616
15	4.376	1.298.598	8.394	4.725.018	2.470.201
10	2.903	847.627	5.427	2.962.681	1.583.498
7	1.860	497.718	3.593	1.852.795	959.055
19	5.381	1.536.137	9.883	5.173.783	2.814.278
9	2.529	715.451	4.693	2.452.335	1.321.072
29	8.437	2.489.841	15.962	8.863.100	4.687.632
36	10.439	3.052.501	18.894	9.967.314	5.503.041
34	9.245	2.537.355	17.703	9.274.577	4.844.542
490	140.601	40.885.053	260.431	139.624.587	75.392.070

biamo voluto preventivamente accertarci se nel materiale allo studi fosse rispettata la condizione di omogeneità delle varianze riferite ai singole progenie.

Dovendosi infatti applicare la tecnica dell'analisi della varian per la definizione del coefficiente di correlazione intraclasse tra mez fratelli, il predetto controllo preliminare pone i limiti di attendibili dei risultati ottenuti.

Ci limiteremo a riassumere nell'acclusa tabella II i risultati del elaborazione per il controllo della omoscedasticità effettuati, mediant il χ^2 calcolato col test di BARTLETT.

TABELLA II

Test di Bartlett per il controllo della omoscedasticità.

	Maschi		Femmine	
	6 mesi	12 mesi	6 mesi	12 mesi
$\Sigma (x - \bar{x})^2$	456193,85	965665.76	341427,52	601501,16
$\Sigma \nu_l$ *	470	470	582	582
$\bar{s}^2$	970,63	2054,61	586,64	1033,51
$A = (\Sigma \nu_l) \log \bar{s}^2$	1403,91	1556,99	1611,18	1754,45
$B = \log \bar{s}^2 . \nu_l$	1394,21	1538,35	1604,92	1744,66
A — B	9,70	18,64	6.26	9,79
$\chi^2 = 2{,}3026$ (A — B)	22,3	42,9	14,4	22,5
P, per g.l 19	0,30÷0,20	0,01	0,80÷0,70	0.30÷0,20

* Con la notazione ν_l indicasi il numero dei gradi di libertà della generica p genie l.

Dai valori delle probabilità riportati nella tabella vediamo che p i maschi all'età di 12 mesi, il χ^2 sperimentale risulta di gran lun maggiore al valore tabulato al livello di 0,01.

Si può pertanto concludere che nei maschi, limitatamente al pe vivo considerato alla suddetta età, a differenti valori delle varian nelle 20 progenie studiate corrispondono effettivamente diverse prob bilità.

In altri termini solo per le progenie maschili e per il peso a 12 mesi, il materiale sul quale è stata portata l'indagine è in disaccordo con l'ipotesi della omogeneità delle varianze.

Allo scopo di eliminare per quanto possibile, la causa di errore derivante dall'impiego della analisi della varianza su materiale in cui non è rispettato il suo fondamentale presupposto di applicabilità, si è proceduto alla eliminazione di 5 progenie che dallo spoglio delle elaborazioni presentavano sensibili scarti rispetto alla varianza media ($\bar{s}^2$ = 2054,61).

Le progenie escluse corrispondono, sempre per il sesso maschile e l'età di 12 mesi ai seguenti tori:

Toro	s^2
2	2927,78
6	401,48
7	3527,38
11	869,78
17	649,53

Il test di BARTLETT ricalcolato sulle quindici progenie residue, per un totale di osservazioni pari a 394, porta ad un valore di $\chi^2 = 15,84$ cui corrisponde una probabilità compresa fra 0,5 e 0,3.

Possiamo quindi ritenere di aver raggiunta così una soddisfacente condizione di omoscedasticità anche per le progenie maschili studiate a 12 mesi.

Siccome la correlazione viene calcolata su valori individuali, si è resa necessaria l'esclusione dei suddetti tori anche per i dati di peso riferiti all'età di 6 mesi.

Il valore di $\chi^2 = 15,6$ ricalcolato sulle 15 progenie per un totale di osservazioni pari a 394 conduce a valori di P compresi fra 0,5 e 0,3.

ANALISI DELLA VARIABILITÀ

Sui dati riferiti a 15 e 20 progenie rispettivamente nei maschi e nelle femmine, si è proceduto per i valori del peso vivo a 6 e 12 mesi alla analisi delle varianze e covarianze ottenendo per ciascun sesso, le seguenti matrici complete:

Matrici della dispersione dei pesi a 6 e 12 mesi (1)

	W_{ij}		B_{ij}		T_{ij}	
Maschi	367329,83	423983,16	66105,13	120537,06	433434,96	544520,0
	423983,16	747810,55	120537,06	180184,33	544520,22	927944,0
	g.l. = 379		g.l. = 14		g.l. = 393	
Femmine	341427,52	462154,12	74042,47	75991,35	415469,99	538145,4
	462154,12	601501,16	75991,35	117231,45	538145,47	718732,2
	g.l. = 582		g.l. = 19		g.l. = 601	

Dividendo ciascuna delle soprascritte matrici per i corrispondent gradi di libertà si ottengono le matrici delle varianze e covarianze pes pesi alle suddette età ed in entrambi i sessi.

Se indichiamo con b_{ij} e w_{ij} rispettivamente le matrici della dispe sione tra tori ed entro tori avremo :

	b_{ij}		w_{ij}	
Maschi	4721,7950**	8609,7900	969,2080	1118,68
	8609,7900	12870,3090**	1118,6890	1973,11
Femmine	3896,9721**	3999,5447	586,6452	794,07
	3999,5447	6170,0763**	794,0792	1033,50

Seguendo il precedente schema di calcolo siamo ora in grado procedere alla stima dei valori dell'ereditabilità e della correlazione g netica fra i pesi a sei e dodici mesi.

La matrice delle varianze e covarianze genetiche sarà evidentemen fornita dalla seguente relazione :

$$4\,S_{ij} = \frac{4}{\eta}\,(b_{ij} - w_{ij})$$

ove $\eta = \dfrac{N^2 - \Sigma n_k^2}{N\,(k-1)}$

(4) W_{ij} = matrice devianze e codevianze entro tori
B_{ij} = matrice devianze e codevianze tra tori
T_{ij} = matrice devianze e codevianze totale.

** $P < 0{,}01$.

Poichè : N = numero totale delle osservazioni, n_k = numero dei figli per ciascun toro capostipite (vedi tab. I), k = numero dei tori ; avremo :

(Maschi) : $\eta = 25{,}47$ (Femmine) : $\eta = 29{,}22$

Risolvendo la (5) si ottengono le seguenti matrici :

4 S_{ij} (Maschi)

$$\begin{bmatrix} 589{,}3344 & 1176{,}4588 \\ 1176{,}4588 & 1711{,}3772 \end{bmatrix}$$

4 S_{ij} (Femmine)

$$\begin{bmatrix} 453{,}1592 & 438{,}8044 \\ 438{,}8044 & 703{,}1580 \end{bmatrix}$$

La matrice delle varianze e covarianze fenotipiche si ottiene direttamente applicando l'espressione (4) :

$$\begin{bmatrix} S_{ii} + w_{ii} & S_{ij} + w_{ij} \\ S_{ij} + w_{ij} & S_{jj} + w_{jj} \end{bmatrix}$$

e procedendo alle opportune sostituzioni avremo :

Matrici delle varianze e covarianze fenotipiche

Maschi

$$\begin{bmatrix} 1116{,}5416 & 1412{,}8037 \\ 1412{,}8037 & 2400{,}9592 \end{bmatrix}$$

Femmine

$$\begin{bmatrix} 699{,}9350 & 903{,}7803 \\ 903{,}7803 & 1209{,}2966 \end{bmatrix}$$

Dividendo ora ordinatamente gli elementi delle diagonali principali delle matrici delle varianze e covarianze genetiche per i corrispondenti elementi delle matrici della dispersione fenotipica si ottengono rispettivamente i valori dell'ereditabilità del peso vivo a sei e dodici mesi, in entrambi i sessi.

Nella seguente tabella vengono riassunti i valori dell'ereditabilità riferiti ai due sessi ed all'età considerate, ottenuti mediante la scomposizione ed interpretazione delle fonti di variabilità fenotipica secondo i concetti precedentemente esposti :

TABELLA III

Stime dei valori medi di h^2 in entrambi i sessi e per le predette età.

Vitelli	Mesi 6	Mesi 12
Femmine	0,5278	0,7128
Maschi	0,6474	0,5815

Il valore della correlazione genotipica è stato ricavato giusto la seguente relazione :

$$r_{Gij} = (4\,S_{ii})^{-1/2}\,(4\,S_{ij})\,(4\,S_{jj})^{-1/2} \qquad (6)$$

Operando le opportune sostituzioni avremo :

(Maschi) : 1,1714 (Femmine) : 0,7773

Conforme a quanto abbiamo già detto riguardo all'interpretazione da attribuire alla varianza dovuta all'errore, è facile ricavare ora la matrice delle stime dei valori della variabilità ambientale, la cui valutazione risulta della massima importanza per la determinazione della correlazione ambientale.

Avremo pertanto :

$$E_{ij} = w_{ij} - 3\,S_{ij} \qquad (7$$

Tale matrice calcolata per ciascun sesso assume i seguenti valori :

E_{ij} (Maschi)

$$\begin{bmatrix} 527{,}2072 & 236{,}3449 \\ 236{,}3449 & 689{,}5820 \end{bmatrix}$$

E_{ij} (Femmine)

$$\begin{bmatrix} 246{,}7758 & 464{,}9759 \\ 464{,}9759 & 506{,}1386 \end{bmatrix}$$

Il rapporto fra la covarianza ambientale alla media geometrica delle singole varianze :

$$r_{Eij} = (E_{ii})^{-1/2}(E_{ij})\,(E_{jj})^{-1/2} \qquad (8$$

definisce com'è noto, il coefficiente di correlazione ambientale, il quale calcolato nei due sessi assume i seguenti valori :

(Maschi) : 0,3920 (Femmine) : 1,3157

Possiamo fin da adesso osservare la presenza di errore di campionamento per le stime riguardanti la correlazione genetica nei maschi e quella ambientale nelle femmine.

A parte tale errore responsabile dei valori superanti l'unità, le conclusioni che possono trarsi dai risultati testè ottenuti confermano in linea di massima quelle raggiunte dai diversi Autori in materia di analisi genetica della variabilità fenotipica, riguardante i bovini da carne e ciò sia nei confronti del peso vivo quanto nei confronti dell'accrescimento.

In via assolutamente generica sia i valori dell'ereditabilità del peso vivo, quanto quelli della correlazione genetica riscontrati fra i pesi nel corso dell'accrescimento, assumono nel materiale allo studio, valori così elevati da permettere sia pure in via largamente approssimata la formulazione di alcune considerazioni circa i criteri da seguire nella selezione

Interpretazione e discussione dei risultati

Dall'esame dei parametri ottenuti emerge un comportamento differenziale dei due sessi sia per quanto riguarda le stime di ereditabilità, sia per quanto concerne i valori delle correlazioni genetica ed ambientale.

Mentre infatti, per quanto riguarda i maschi, l'ereditabilità del peso vivo valutato a dodici mesi, risulta notevolmente superiore al valore di tale parametro per lo stesso carattere considerato a mesi sei; nelle femmine si verifica il fatto opposto.

È interessante osservare che, mentre nei maschi l'incremento di h^2 ottenuto nel corso dello sviluppo, risulta assai sensibile (0,1850); per le femmine il decremento si mostra assai più basso e pari a 0,0659.

Allo scopo di interpretare in via approssimativa la causa più probabile dell'incremento di ereditabilità nei maschi è stata in precedenza calcolata la correlazione ambientale. A tal riguardo, sempre facendo astrazione dall'errore di campionamento già accennato, possiamo, sulla scorta dei valori ottenuti, affermare che in entrambi i sessi col progredire dell'età si siano verificate delle variazioni ambientali.

Infatti, l'influenza ambientale comune ai pesi durante l'accrescimento può ritenersi modica nei maschi, mentre si presenta elevatissima nelle femmine.

La spiegazione che possiamo dare al fenomeno concorda con quella in precedenza data da P. G. Buiatti (1954) e si compendia in due punti fondamentali:

1) Siccome nei maschi lo svezzamento viene iniziato in epoca più precoce che nei confronti delle femmine, ciò comporta una maggiore dipendenza di quest'ultime dall'influenza materna intesa come capacità di allattamento della madre.

Poichè tale attitudine presenta nella razza Chianina una modica variabilità, ne risulta che l'ambiente alimentare delle femmine viene a trovarsi in condizioni di maggiore uniformità di quello dei maschi.

Sotto tale aspetto potrebbe pertanto essere spiegata la maggiore ereditabilità presentata dalle femmine nei confronti del peso vivo a sei mesi di età a paragone dell'ereditabilità dello stesso carattere presentato dai maschi.

Viceversa dopo lo svezzamento l'ambiente zootecnico ed alimentare delle vitelle diventa notevolmente più variabile di quanto fosse durante il periodo dell'allattamento.

In realtà ciò avviene per l'azione preferenziale che l'Allevatore

esercita nei riguardi dell'altro sesso, soprattutto in previsione di mostr rassegne, mercati ed altro. A conforto di tale tesi sta l'elevato valo della correlazione ambientale rilevato nelle femmine.

Questa maggior variabilità ambientale nei riguardi delle femmine svezzamento compiuto spiegherebbe pertanto l'incremento di ereditab lità verificatosi nei maschi durante lo sviluppo ed accompagnato da c rispondente decremento nelle femmine.

2) Nei maschi, i valori della varianza ambientale riferiti alle d età pur presentando un incremento col progredire dello sviluppo n sembrano tuttavia tali da giustificare l'ipotesi in base alla quale si pos ritenere che l'aumento di ereditabilità sia da ricondursi a preminen azioni di tipo ambientale.

Infatti, essendo la varianza ambientale del peso a sei mesi uguale circa il 76% di quella presentata ad un anno di età, sembra del tutto r gionevole avanzare l'ipotesi secondo la quale l'incremento di ereditabili sia da attribuire ad un apporto addizionale di variabilità genetica c per il fatto di manifestarsi con l'età farebbe pensare ad un probabi intervento di fattori genetici condizionanti l'attività endocrina di ti maschile.

Per quel che riguarda le conclusioni che possono trarsi nei confron della selezione, è evidente come gli elevatissimi valori della correlazio genetica ci permettano di dedurre che l'incremento dal punto di vista g netico di uno dei due pesi porta senza dubbio all'incremento dell'altr onde sarebbe sufficiente tener conto nella selezione, del peso a sei me di età.

Così ad esempio, se viene esercitata la selezione nei confronti d peso a mesi sei, gli incrementi genetici che si possono prevedere in ba alla risposta correlata sono forniti dalla relazione:

$$\Delta G_j = r_{Gij} \frac{\sigma_{Gj}}{\sigma_{Gi}} \Delta G_i \qquad (1$$

ove con le notazioni $\Delta G_{j,i}$ vengono indicati rispettivamente gli incr menti genetici a dodici mesi ed a sei mesi di età; r_{Gij} rappresenta la co relazione genetica ed infine $\sigma_{Gi,j}$ indicano rispettivamente le deviazio standard genotipiche del peso vivo a sei e dodici mesi.

Supponendo ora che il differenziale di selezione sia pari alla devi zione standard fenotipica del peso vivo considerato a mesi sei, l'incr mento genetico ottenibile basando la selezione alla predetta età sa uguale a:

$$\Delta G_i = h_i \sigma_{Gi} \qquad (1$$

in cui $h_i = \sqrt{h^2_i}$

Introducendo quest'ultima espressione nella (9) otteniamo:

$$\Delta G_j = \frac{cov\ (G_i\ G_j)}{\sigma_{Pi}} = 4\ S_{ij}\ (S_{ii} + w_{ii})^{-1/2} \qquad (11)$$

Tenendo presente una particolare pressione di selezione espressa come percentuale di individui scelti per la riproduzione sul totale degli individui osservati, potremo con l'aiuto delle apposite tavole calcolate da FISHER and YATES (1948), determinare il differenziale di selezione in termini di deviazione standard della popolazione.

Se indichiamo con $\bar{i}$ tale parametro la sopra scritta relazione diventa:

$$\Delta G_j = 4\ S_{ij}\ (S_{ii} + w_{ii})^{1/2}\ \bar{i} \qquad (11')$$

Introducendo nella (11') i valori dedotti in precedenza otteniamo, nel caso che la selezione riguardi le sole femmine, il seguente incremento genetico:

$$\Delta G_{(12\ mesi)} = \frac{438{,}8044}{26{,}456285}\ \bar{i} = 16{,}7195432\ \bar{i}$$

Immaginando ora di esercitare una pressione selettiva del 5%, troviamo che il differenziale espresso in termini di deviazione standard è pari a 2,06.

Poichè il differenziale risulta in tal caso pari a 2,06 volte la deviazione standard fenotipica, avremo:

$$\Delta G_{(12\ mesi)} = 16{,}7195432(2{,}06) = 34{,}167195$$

La possibilità di esercitare una previsione dell'incremento genetico realizzabile mediante selezione del peso vivo ad un anno, tenendo conto del solo peso a mesi sei, suggerisce infine una ultima considerazione che per la sua importanza ai fini pratici del lavoro di selezione costituisce senz'altro il risultato più interessante della nostra ricerca.

Alludiamo alla possibilità di utilizzare il peso a sei mesi di età nel giudizio della discendenza dei riproduttori effettuato mediante progeny-test.

Così, se in base all'indice proposto da JOHANSON-ROBERTSON oppure da LUSH and WRIGHT (1947) il valore riproduttivo del maschio viene valutato mediante dati rilevati sulla progenie considerata a sei mesi, è evidente il notevole vantaggio conseguibile agli effetti dell'incremento produttivo annuo realizzabile con la selezione.

Sappiamo infatti come tale incremento oltrechè dipendere dalla pre-

cisione con la quale è possibile stimare il genotipo in base al fenotipo, di penda altresì dal differenziale e dall'intervallo di generazione.

È su quest'ultimo elemento che intendiamo porre la nostra attenzione, in quanto effettuando il progeny-test sulla scorta dei rilievi riferiti al peso considerato a sei mesi, è senz'altro possibile accelerare il lavoro selettivo diminuendo di conseguenza il predetto intervallo fra le generazioni, che figurando a denominatore della relazione esprimente l'incremento suddetto, porta evidentemente ad un maggior progresso della selezione.

Infatti, anticipando il progeny-test sarà possibile esprimere il giudizio in base alla discendenza su un maggior numero di riproduttori evitando così che la stima di essi si prolunghi sensibilmente nel tempo.

Compiamo il gradito dovere di ringraziare i Proff. R. E. Scossiroli e C. A. Smith, rispettivamente dell'Istituto di Genetica dell'Università di Pavia e del Galton Laboratory, University College, London, per il gentile interessamento ed i preziosi consigli.

BIBLIOGRAFIA

Barbensi G., 1952. — *Introduzione alla biometria*. Vallecchi, Firenze.

Barbensi G., Salvi F. — *Le matrici in biometria*. In corso di preparazione.

Buiatti P. G., Giuliani R., 1952. — *La razza Chianina*. Centro per lo studio della Genetica animale del C.N.R., Univ. di Firenze, Isp. Comp. dell'Agricoltura.

Fisher R. A., 1946. — *Statistical methods for research workers*. Oliver and Boyd Edimburg.

Fisher R. A., Immer F. R. and Tedin O., 1932. — *The genetical interpretation of statistics of the third degree in the study of quantitative inheritance*. Genetics, 17: 107-124.

Knapp B., Clark R. T., 1947. — *Genetic and Environmental Correlations between growth rates of beef cattle at different ages*. Journal of Animal Science.

Lerner M., 1950. — *Population Genetics and animal improvement*. Cambridge University Press, London.

Li C. C., 1956. — *The concept of path coefficients and its impact on population genetics*. Biometrics, 12: 2.

Lush J. L., 1954. — *Rates of genetic changes in population of farm animals*. Proc. 9th Int. Congr. Genetics, Bellagio, pp. 589-599.

Mather K., 1949. — *Biometrical Genetics*. Methuen and Co., London.

Scossiroli R. E., 1955. — *Genetica statistica applicata alla Zootecnia*. Malfasi, Milano.

—, 1959. — *Il metodo statistico nella genetica*. Univ. degli Studi, Roma.

SMITH C. A. B., 1954. — *Biomathematics*. C. Griffin and Co., London.

—, 1957. — *On the estimation of intraclass correlation*. Ann. of Human Genetics, **21**: 363-373.

SMITH C. A. B., FIELLER E. C., 1951. — *Note on the analysis of variance and intraclass correlation*. Annals of Human Genetics, **16**: 97-104.

WRIGHT S., 1934. — *The method of path coefficients*. Ann. Math. Stat., **5**: 161-215.

YAMADA Y., 1958. — *Heritability and Genetic Correlation in Economic Characters in Chickens*. Japan. Journ. of Genetics, **33**: 13-22.

SUMMARY

After a brief report about the methodological principles, basic for the actual concepts of the quantitative genetics, the A. analyses the phenotypic variability of the weight in the living calfs of the Chianina breed.

Making use of the individual weights at six and twelve months of age of 602 females and 394 males respectively subdivided in 20 and 15 progenies, in both sexes and at the mentioned ages, the mean heritability level has been studied.

The high values for the estimates of h^2 obtained by paternal half-sib correlation method justify a genetic improvement based principally on the phenotypic criterion. The high genetic correlation resulted in both sexes between the weights at the two considered ages, allows also the setting of the selection work, utilising the weights at six months of age for the estimate of the reproducer's progeny obtained by the progeny-test.

RIASSUNTO

Dopo una breve esposizione dei principî metodologici che stanno alla base dei fondamentali concetti della moderna Genetica quantitativa, l'Autore procede all'analisi della variabilità fenotipica del peso vivo nei vitelli di razza Chianina.

Utilizzando i valori individuali del peso a sei e dodici mesi di 602 femmine e 394 maschi suddivisi rispettivamente in 20 e 15 progenie, è stato studiato in ciascun sesso, alle età sopra specificate, il grado medio di ereditabilità.

Le stime di h^2 ottenute col metodo della correlazione intraclasse tra fratellastri entro il riproduttore maschio, presentano valori di entità tale da giustificare un miglioramento genetico basato principalmente sul criterio della selezione massale.

La elevata correlazione genetica riscontrata in entrambi i sessi tra i pesi delle due età considerate, permette altresì di impostare il lavoro di selezione utilizzando il peso a sei mesi di età nel giudizio della discendenza dei riproduttori effettuato mediante progeny-test.

MESSERI ENRICO

CONSIDERAZIONI ECOLOGICHE SUL COLORE DEGLI OCCHI FRA I SOMALI

(con Tavola LXVII e 10 figure nel testo) *

In redazione: il 10 Febbraio 196

È noto che la variabilità di un carattere biologico è dovuta a cause endogene (genetiche) ed esogene (ambientali) e che nella ampiezza di questa giocano complementariamente i due elementi. Spesso le variazioni di ordine ambientale si sommano con quelle di origine endogena concorrendo alla espressione del fenotipo e ciò, non ammettendo la ereditarietà dei caratteri acquisiti, come ha potuto dimostrare JOHANNSEN. Egli distingue infatti in ogni soggetto l'aspetto esterno o fenotipo (nel caso in esame il colore dell'iride) e il patrimonio ereditario o genotipo (nel caso in parola geni cromogeni dell'iride) e afferma che la selezione esplicata dall'ambiente non ha presa sul genotipo, ma solo sulle variazioni del fenotipo per cui i caratteri acquisiti non sono ereditari. Il genotipo pertanto non è capace di determinare un dato carattere nel fenotipo ma solo una « norma di reazione » (WOLTEREK) alle condizioni ambientali. La selezione non ha presa su soggetti genotipicamente uguali, ma solo su una popolazione eterogenea favorendo il carattere che incontra una facile adattabilità ecologica e osteggiando quello che incontra un forte attrito con le esigenze dell'habitat. La selezione pertanto estrae dal genotipo di una popolazione le variazioni ereditarie insite in esso, tanto che si può paragonare l'azione dell'ambiente a quella di una forza che tenta di deformare un corpo elastico, il quale ritorna nella posizione di partenza appena questa sollecitazione è cessata (MONTALENTI 1959). Naturalmente se la forza esterna oltrepassa il limite di elasticità del genotipo si crea una frattura in questo con tutte le conseguenze che il nuovo assetto genotipico comporta nel caso di una mutazione, perciò se si vuole essere esatti è errato il principio che « l'ambiente è estraneo alla eredità » e sarebbe più giu

* Lavoro eseguito nell'Istituto di Fisiologia Generale dell'Università di Messina.

to condizionare questo dogma alla intensità della *vis* esogena che opera ul genotipo.

Pur sapendo da innumerevoli ricerche che il colore degli occhi è ereditario, le molteplicità delle interpretazioni proposte rendono tuttora oscura la visione genodinamica del carattere, e ciò sopratutto per la peculiarità qualitativa e non quantitativa del colore degli occhi. Per poter penetrare addentro al complesso gioco ereditario è utile, e direi quasi necessario, tradurre la qualità in quantità: ciò che ha tentato di fare il MARTIN sintetizzando in 16 classi la variazione cromatica dell'iride umana. La scala di Martin è stata impiegata anche sulle nostre ricerche sulle tribù somale, effettuate dal Dr. G. Moggi e dal Sig. R. Bavazzano (dell'Istituto Botanico di Firenze), componenti di una missione di recente inviata in Africa Orientale dalla nostra Università e sovvenzionata dal Consiglio Nazionale delle Ricerche per fare dei rilievi naturalistici (botanici, zoologici, antropologici). La ricerca è stata eseguita su 278 soggetti di ambo i sessi (183 M e 95 F) appartenenti a diverse cabile della Somalia meridionale e centrale (fig. 10). Sul collettivo sono stati rinvenuti 74 soggetti che presentano una intensità cromatica dell'iride valutabile col n. 1 della scala di Martin; 73 del n. 2; 76 del n. 3; 32 del n. 4; 13 del n. 5; 6 del n. 6 e 4 del n. 7. Nessun rappresentante degli altri numeri dall'8 al 16 (Vedi Tabella I).

TABELLA I

Colore occhi	N.	%
1	74	26,62
2	73	26,26
3	76	27,34
4	32	11,51
5	13	4,69
6	6	2,15
7	4	1,43
8	0	0

M = 183
F = 95
Totale 278

Tradotta la frequenza assoluta in quella relativa si ha: per il n. 1 = 26,62%; n. 2 = 26,26%; n. 3 = 27,34%; n. 4 = 11,51%; n. 5 = 4,69%;

n. 6 = 2,15% ; n. 7 = 1,43% (fig. 1). Analizzando questo dato si no innanzitutto la esclusività dei colori scuri, mancando addirittura tut la gamma di media e debole intensità corrispondente al grigio e al c leste. Inoltre si nota che pur in questa esclusività scura la frequen

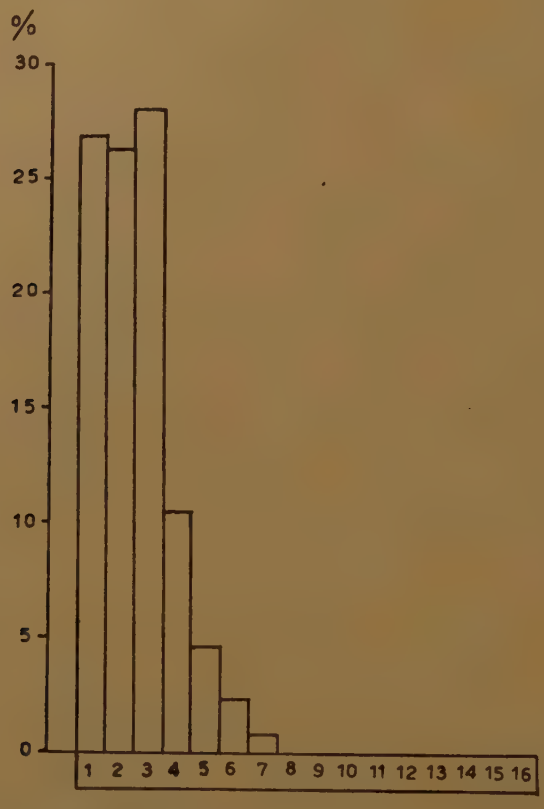


Fig. 1 — Frequenza dell'intensità del colore degli occhi, secondo le 16 classi de scala di Martin, reperite in Somalia.

massima si trova nei colori relativi alle prime tre classi della sca di Martin, con una rapida discesa di valori per le intensità meno estr me del 4 e del 5 e con rapida lisi frequenziale per il n. 6 e il 7, do si nota un arresto brusco, senza neanche un solo rappresentante, per n. 8 e successivi. Soffermandoci a considerare questo aspetto così drasti del fenomeno, possiamo pensare che la selezione ambientale ha potu operare per questo carattere con una energia eccezionale tanto da ra

giungere, sia pure attraverso molte generazioni, una eliminazione assoluta dei fenotipi più chiari, secondo una risultante armonica del secondo tratto della curva binomale, come appare dall'andamento grafico del fenomeno. Ciò sta ad indicare che la vis selettiva ha operato con la massima severità permettendo una graduale resistenza residua nei colori meno estremi per la verosimile presenza di geni satelliti modificatori. Comunque il fenomeno appare secondo una norma di reazione armonica e graduale, come se questo gruppo etnico fosse il prototipo medio della nostra specie, e la scala di Martin fosse di conseguenza articolata nelle sole prime 7 classi di graduazione cromatica dell'iride.

Facendo ora il confronto con i dati elaborati in un nostro precedente studio in Sicilia (MESSERI 1960) (Vedi Tabella II) si nota che su 258 soggetti di ambo i sessi (M = 126; F = 132) la frequenza nelle 16 classi di Martin è la seguente:

TABELLA II

Colore N.	%	Colore N.	%
1	5,81	9	1,93
2	13,97	10	0,38
3	18,20	11	1,16
4	13,56	12	0,77
5	12,01	13	0,77
6	10,08	14	0,77
7	8,52	15	2,70
8	3,48	16	5,81

M = 126
F = 132
Totale 258

Osservando la Tabella II si nota che i valori frequenziali nelle varie classi cromatiche comprendono tutti i numeri della scala di Martin, vale a dire tutte le possibilità di variazione per questo carattere nel mondo (fig. 2). Dalla rappresentazione grafica si nota anche che il fenomeno presenta un tracciato caratterizzato da una curva binomiale con una rapida ascesa, e una più lenta discesa, una stasi e una ripresa ascensionale nelle ultime due classi della scala. Nell'insieme i

valori risultano spostati a sinistra, però anche a destra per quanto in più modeste proporzioni esiste una discreta frequenza proprio all'estremo dello schieramento cromatico.

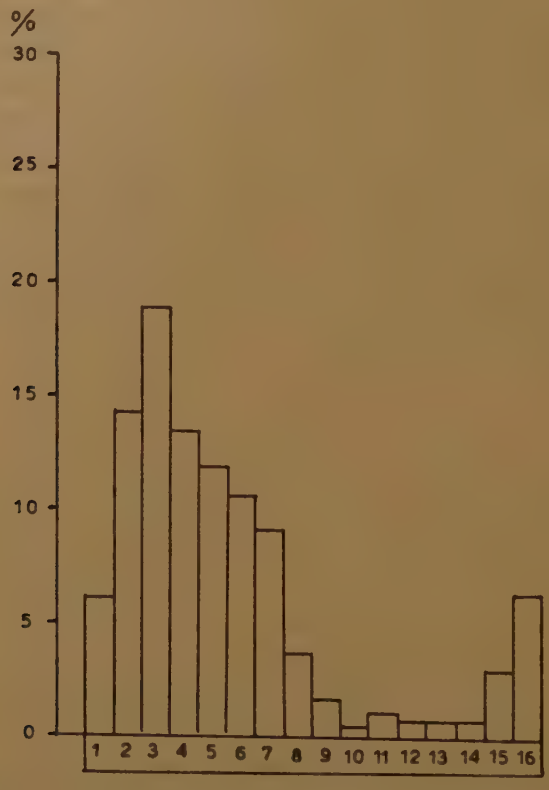


Fig. 2 — Frequenze dell'intensità del colore degli occhi (scala di Martin) reperite in Sicilia.

È da considerare che le vicende storiche della Sicilia possono spiegarci le caratteristiche di questo fenomeno, potendo considerare la discreta frequenza del n. 15 e 16, dopo una stasi nei numeri precedenti come una «risorgiva genica» di fattori recessivi di origine normanna (Messeri 1960).

Se facciamo il confronto con i dati reperiti in Toscana dal Parenti (Vedi Tabella III), notiamo che mancano del tutto i rappresentanti dei due estremi della scala cromatica del Martin (1 e 16) e il tracciato del fenomeno è rappresentato da una rapida ascesa con l'acme al n. 4 rapida

discesa fino al n. 6 con ripresa al n. 7 e discesa fino al n. 9, con una lieve ascesa al 10, massima depressione in corrispondenza dell'11 e ascesa fino al 15, in generale pertanto appare un tracciato irregolare con orientamento della massima frequenza a sinistra meno accentuato del precedente, oltre alla mancanza dei due estremi 1 e 16, ben efficienti in Sicilia (fig. 3).

TABELLA III

Colore N.	%	Colore N.	%
1	0	9	1,69
2	5,66	10	5,70
3	15	11	0,33
4	21	12	1,33
5	15,66	13	3
6	5	14	3,33
7	14,33	15	3
8	5	16	0

su N. 328 soggetti

Confrontando ora il tracciato dei somali con quello dei siciliani e dei toscani vediamo ben chiaro che la curva delle frequenze si sposta sempre più verso sinistra passando dal Nord al Sud assumendo il fenomeno una nota latitudinaria molto evidente. Pur non potendo fare un raffronto diretto, data la diversità della scala usata in una ricerca più a nord della Toscana, osserviamo che Marcozzi ha studiato su 207 soggetti (113 M, 107 F) del tipo raziale adriatico nel Veneto, trovando una percentuale di occhi bruni del 39,5%, di castani del 14,5%, di grigi del 20% e di azzurri del 25,5%. Come si nota la massima frequenza è data dagli occhi bruni poi seguono gli azzurri e i colori misti intermedi con una curva ancora più centralizzata rispetto a quella toscana.

Appare evidente da quanto siamo andati esponendo che il fenomeno si inserisce fenotipicamente su una chiara norma geografica, vale a dire segue una legge ecologica. L'ambiente impone con le sue esigenze un effetto selettivo molto evidente, favorendo i colori chiari dell'iride nel Nord e ostacolandoli sempre più procedendo verso il Sud, fino a fare scomparire del tutto i colori chiari in popolazioni equatoriali, quali sono le tribù da noi studiate.

Il colore dell'iride è dato dalla variabile elaborazione e deposizio
di pigmento nelle maglie del tessuto irideo e dalla struttura istologi
dell'organo stesso. Alla complessità della sua genesi corrisponde ver
similmente una complessità degli agenti responsabili, trattandosi pr

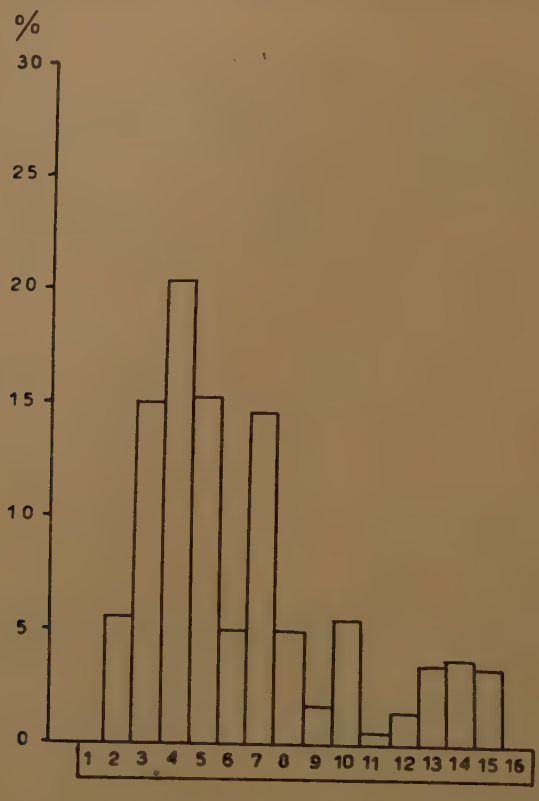


Fig. 3 — Frequenze dell'intensità del colore degli occhi (scala di Martin) reperit
in Toscana.

babilmente di una azione polimerica e polifenica. A questo complesso
meccanismo si aggiunge quale forza di selezione l'influenza peristatica
sopratutto della luce. La pigmentazione dell'iride secondo gli studi d
HURST si distingue in forma duplice e semplice. La prima è determi
nata da colorazione bruna anteriormente e azzurra posteriormente (co
lore bruno o castano verde), la seconda con deposizione sulla faccia po
steriore dell'iride determina la tonalità chiara azzurra dell'occhio. L'oc

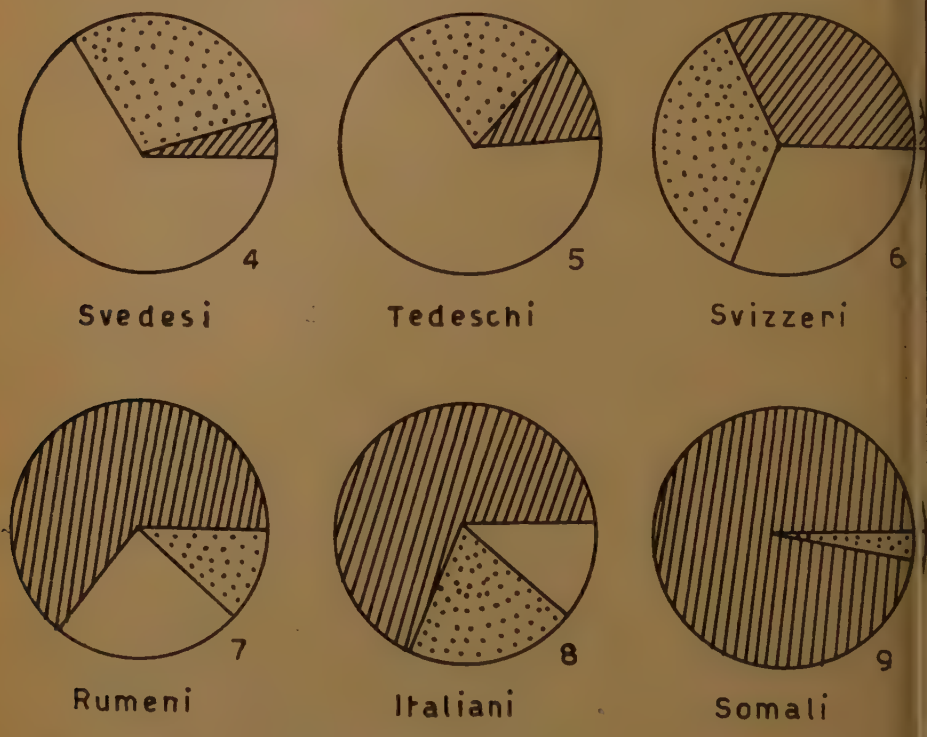
hio bruno domina sull'azzurro, che è recessivo (DAVENPORT, FISCHER, HURST, ecc.). È noto che la funzionalità dell'iride è collegata direttamente con la necessità della camera oscura del sistema diottrico per permettere una visione perfetta a livello della retina, che per via nervosa si trasmette ai centri corticali della regione colcarina. Un occhio depigmentato, come si nota negli albini, non permette una funzione visiva efficiente per la mancanza di questa protezione del sistema diottrico dalla luce ambientale. Un occhio chiaro (azzurro) permette una ottima funzione diottrica se esposto a luci tenui, un occhio molto scuro è invece ben protetto anche se esposto a intensità luminosa molto elevata e durevole. È naturale che ambienti molto luminosi favoriscano gli occhi scuri e ambienti tenuamente illuminati permettono anche una alta frequenza degli occhi azzurri, si tratta di una esigenza ecologica che si traduce in una selezione genetica con una variabilità fenotipica correlata.

La selezione opera lentamente nei millenni attraverso numerosissime generazioni agendo sull'allelotipo raziale. Secondo Parenti la trasmissione ereditaria del carattere può essere considerata come dipendente da tre norme genetiche riconducibili a tre raggruppamenti qualitativamente diversi, con eterovalenza intracoppia e isovalenza intercoppia. Queste tre norme corrisponderebbero alle tre modalità visibili (castano, grigio-verde e azzurro) combinandosi in varia maniera in tutta la gamma dei colori naturali dell'iride umana. Se si può ammettere che la modalità dominante corrisponde realmente a quella originale della specie (SCHEINFELD 1952) e le altre sono mutanti, in tal caso l'agente peristatico (luce) avrebbe soffocato queste ultime in maniera drastica nelle tribù somale, mentre una minore intensità luminosa in Sicilia avrebbe permesso non solo la riduzione della frequenza nelle classi più scure, ma persino una notevole presenza di recessività pura, di origine normanna (occhi celesti). Una ancor più scarsa (e meno duratura) luminosità in Toscana avrebbe di più favorito le percentuali dei fenotipi recessivi, e il fenomeno appare ancor più evidente nel Veneto.

Il colore frequentemente azzurro-grigio negli occhi dei popoli nordici (scandinavi) rappresenta l'estremo affermarsi della recessività di questo carattere etnogenetico, che chiaramente appare improntato alle esigenze esogene della *vis luminosa* dell'habitat. Questo fenomeno pertanto rientra nei limiti della ecologia, intesa quale adattamento della vita all'ambiente, ed è consentito dal grado di elasticità delle norme genetiche che si trovano alla base dell'allelotipo di una data popolazione.

Questa constatazione trova una estrema evidenza nel raffronto che possiamo operare sulla intensità del fenomeno a diverse latitudini (in

zone equatoriali, temperate, boreali). È da notare che ai due estrer latitudinari troviamo allo stato di quasi esclusività le due probabi omozigosi (dominante al sud, e recessiva al nord). Dalle ricerche



Figg. 4-9 — Frequenza dell'intensità del colore degli occhi, secondo tre classi (brui medio, chiaro) di Martin. Il colore bruno è rappresentato dal tratteggio, il colore med dal punteggio, quello chiaro dal bianco.

Hanneson (in Martin 1928, pag. 521) eseguite in Islanda, con una sca cromatica a tre classi, risulta che quella popolazione presenta il colo delle iridi molto chiaro (celeste 65,5%, grigio 31,5%, scuro 3%). Se co frontiamo i dati riferiti dal Martin (pag. 405, Lehrbuch der Anthrop logie) sulla frequenza degli occhi scuri (1-6) medi (7-12) e chiari (13-1 fra gli Svedesi, Tedeschi, Svizzeri, Rumeni e Italiani con quelli da n reperiti nei Somali (figg. 4, 5, 6, 7, 8, 9) osserviamo evidentissim mente delinearsi il fenomeno ecologico, vale a dire la correlazione a tropo-ambientale del colore delle iridi in funzione della latitudine

della relativa luminosità dell'habitat. Negli Svedesi è manifesta una alta frequenza degli occhi chiari (66,7%) e grigi (28,8%) e scarsissima di quelli scuri (4,5%). Nei Tedeschi il fenomeno si attenua, notandosi

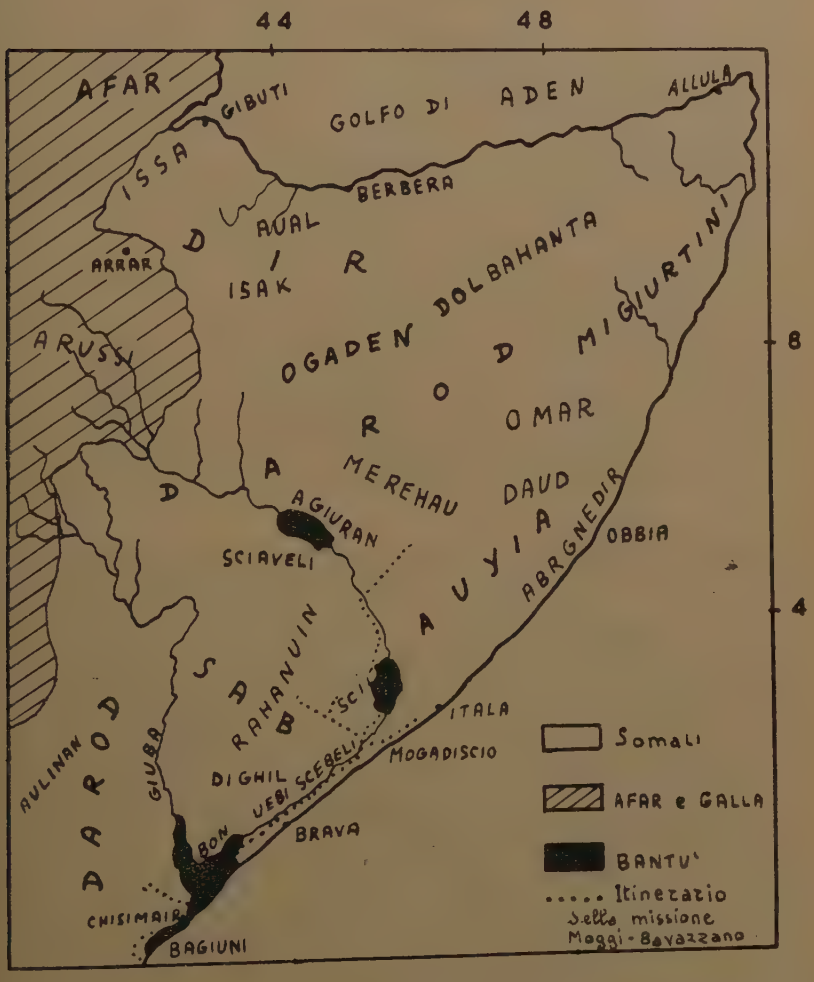


Fig. 10 — Carta geografica delle popolazioni della somalia (da Puccioni in Biasutti).

gli occhi chiari nel 44,5%, quelli grigi nel 22,9% e quelli scuri nel 12,6%; negli Svizzeri si attenua ancora di più con occhi chiari 28,2%, grigi 37,9%, scuri 33,8%. Negli Italiani (Livi) si invertono le proporzioni presentando occhi chiari nel 10,3%, scuri 69,1% e grigi nel

20,6%. Infine nei Somali scompare del tutto l'occhio chiaro e rimane ridotto all'1,43% il colore grigio più tenue, rimanendo quasi esclusivamente rappresentati gli occhi scuri, nelle gamme più accentuate (98,57%) (fig. 9).

Noi abbiamo considerato un solo carattere ereditario, ma in effetti sono migliaia i caratteri che seguono la stessa sorte selettiva da parte dell'ambiente. Le relazioni che passano fra eredità e ambiente sono di natura dinamica (Dobzhansky 1959) e in questo dinamismo gioca la norma di reazione (Khünn 1945). Oggi si ammette che almeno la differenziazione dei grandi gruppi raziali sia dovuta a fattori naturali che hanno operato sull'evento delle mutazioni e dei drifts. Si nota infatti in natura che le pigmentazioni scure (pelle, capelli e occhi) occupano di preferenza la fascia equatoriale scoperta, molto esposta alla luce, risultando la pigmentazione fortemente correlata con il fattore luce a sfondo protezionale (nella pelle e capelli) (Coon e Garns 1950). Mentre è chiaro il vantaggio del colore scuro dell'iride per un habitat intensamente luminoso, come abbiamo già accennato, non altrettanto evidente appare il vantaggio dell'iride chiara per un ambiente poco illuminato. Esiste però una netta correlazione fra pigmentazione dello strato anteriore della iride e quella del fondo degli occhi, tanto che in quelli più pigmentati esistono granuli di melanina in tutto l'ambito della retina, mentre nell'occhio celeste la melanina è circoscritta al così detto «strato pigmentato» che scarsamente viene attraversato dalla luce, la quale per giungere ai coni e bastoncelli deve attraversare un certo spessore della retina che sarà più agevolmente superato se scarsamente pigmentato (Coon e Garns 1950). Questo fenomeno di concomitanza della pigmentazione dell'iride e del fondo dell'occhio, può rendere conto di sinergismi funzionali, atti alla difesa di organi ed apparati nella loro lotta di attrito verso le esigenze dell'ambiente.

La norma ecologica di questo fenomeno può costituire una nozione di grande interesse anche per il geografo in quanto le variazioni ambientali trovano una netta corrispondenza con le reazioni biologiche.

BIBLIOGRAFIA

Biasutti R., 1959. — *Razze e Popoli della Terra. I.* Utet, Torino.

Boyd W. C., 1950. — *Genetics and the races of Man.* Little, Boston.

Coon C. and Garns S., 1950. — *Races.* Thomas, Springfield.

Dobzhansky T., 1959. — In: Roberts 1959, pp. 49-61.

Enrico Messeri — Considerazioni ecologiche sul colore degli occhi fra i Somali.

D'Ancona A., 1942. — *Lotta per l'esistenza*. Einaudi, Torino.
Ford E. B., 1948. — *Genetica*. Longanesi, Milano.
Gates R. R., 1948. — *Human Genetics*. McMillan, New York.
Marcozzi V., 1944. — *Eredità del colore degli occhi*. Riv. di Antrop., **35**: 153-170.
Martin F., 1928. — *Leherbuch der Anthropologie*. Fischer, Jena.
Messeri E., 1955. — *Ecologia umana*. Archiv. Antropol. Etnol. **85**: 17-81.
—, 1959. — *Considerazioni sulla morfologia auricolare in Calabria*. Caryologia, **11**: 368-381.
—, 1960. — *Considerazioni sulla espressione fenotipica del colore degli occhi in Sicilia e in Toscana*. Caryologia, **13**: 224-239.
Montalenti G., 1959. — *Genetica*. Treves Lupi, Napoli.
Khünn A., 1945. — *La teoria dell'ereditarietà*. Einaudi, Milano.
Parenti R., 1953. — *Contributo allo studio della trasmissione del colore delle iridi*. Archiv. Antropol. Etnol., **83**: 5-40.
—, 1955. — *Biologia delle razze umane*. Libreria goliardica, Pisa.
Roberts D. F., 1959. — *Natural selection*. Pergamon Press, London.
Sheinfeld A., 1952. — *L'ereditarietà*. Longanesi, Milano.
Spadolini I., 1953. — *Fisiologia umana*. UTET, Torino.
Stern C., 1950. — *Principles of human genetics*. Freeman, S. Francisco.
Touraine A., 1955. — *L'eredité en medicine*. Masson, Paris.
Vallois H., 1948. — *Les races Humaines*. Press Universitaire, Paris.

SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA LXVII

Figg. 1-2. — Elementi indigeni dell'isola Alessandra nel basso Giuba.

SUMMARY

The author has studied the eye-color of some somaly tribes and has interpreted the results of this research at the light of genetics and ecology.

RIASSUNTO

L'A. ha studiato il colore degli occhi di alcune tribù somale ed ha inquadrato i dati della ricerca con criteri genetico ed ecologico.

Pubblicazioni del " CENTRO DI STUDIO PER LA CITOGENETICA VEGETALE „ DEL CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE

diretto dal Prof. ALBERTO CHIARUGI

N. 226 - 257 (*)

226. Battaglia Emilio — *Scilla autumnalis* L.: biotipi 2n, 4n, 6n e loro distribuzione geografica. (Caryologia, X: 75-95, Tavole XIV-XVI e 11 figure nel testo, 1957).

227. Battaglia Emilio — La sostituzione dell'idrolisi a caldo con l'idrolisi a temperatura ambiente (« idrolisi fredda ») nel metodo Feulgen. (Rendic. Accad. Naz. Lincei, Cl. Sci. Fis. Mat. e Nat., serie VIII, Vol. XXII, 188-192, 1957).

228. Meletti Paolo — Azioni citologiche di elettroliti e non-elettroliti sulla cellula vegetale con particolare riguardo agli effetti di soluzioni ipertoniche. (Caryologia, X: 161-180, 1957).

229. Avanzi Silvana — Inibizione dell'effetto citologico dell'acetato di Tallio per mezzo della cisteina. (Caryologia, X: 96-101, 1957).

230. Battaglia Emilio — La microfotografia al contrasto di fase nello studio della morfologia cromosomica. (Caryologia, X: 46-54, Tavole VII-XII, 1957).

231. Battaglia Emilio — Conservazione in frigorifero dei preparati temporanei lutati, di materiale colorato secondo il metodo Feulgen. (Caryologia, X: 159-160, 1957).

232. Messeri Enrico — Osservazioni sulla germinazione, lo sviluppo e la discendenza di *Vicia sativa* L. nata da semi trattati con raggi X. (Caryologia, X: 209-243, con 20 figure nel testo, 1957).

233. Fabbri Fernando — Citogenetica della *Notholaena Marantae* (L.) R. Br. (Sinopteridaceae). (Caryologia, X: 388-390, Tavola XLI, e 2 figure nel testo, 1957).

234. Fabbri Fernando — Sondaggi citogenetici nelle Polypodiaceae *sensu stricto*. (Caryologia, X: 402-407, Tavole XLII-XLIV, e 6 figure nel testo, 1957).

235. Fabbri Fernando — L'ottoploidismo di *Adiantum cuneatum* Langsd. et Fisch. (Adiantaceae). (Caryologia, X: 408-411, Tavola XLV, e 3 figure nel testo, 1957).

236. Cortini Carmela — Sviluppo del gametofito femminile in *Malpighia fucata* Ker-Gawl. (Malpighiaceae). (Caryologia, XI: 42-56, 26 figure nel testo, 1958).

(*) Continuazione da Vol. II: 370-372 (1950); Vol. III: 384-386 (1951); Vol. V: 404-405 (1953); Vol. VII: 219-220 (1955); Vol. VIII: 389-390 (1956); Vol. X: 413-414 (1957); Vol. XI: 97-98 (1958).

237. Gori Chiara — Sul cariogramma della *Fritillaria messanensis* Raf. (Caryologia, XI: 28-33, con Tavole I-II e 3 figure nel testo, 1958).

238. Avanzi Silvana — Osservazioni preliminari sugli effetti fisiologici e citogenetici della irradiazione di semi di grano duro « Cappelli » con raggi X e con neutroni termici. (Rendic. Accad. Naz. Lincei, Cl. Sc. Fis. Mat. e Nat., Serie VIII, Vol. XXIII; 159-165, 1957).

239. Gori Chiara — Il numero dei cromosomi dell'*Arum nigrum* Schott var. *apulum* Carano. (Caryologia, X: 454-456, Tav. XLVI e 1 fig. nel testo, 1958).

240. Gori Chiara — Osservazioni preliminari sull'azione citologica di alcune furocumarine dell'essenza di Bergamotto. (Caryologia, XI: 68-71, con 3 figure nel testo, 1958).

241. Battaglia Emilio — Filogenesi del cariotipo nel genere *Urginea*. IV: *U. aurantiaca* Lindberg [= *U. noctiflora* Batt. et Trab. var. *aurantiaca* (Lindberg) Maire]. (Caryologia, XI: 79-96, Tavole IV-V e 7 figure nel testo, 1958).

242. Pagni Paola — Ricerche cito-embriologiche su *Oenothera acaulis* Cav. (Caryologia, XI: 181-201, 26 figure nel testo, 1958).

243. Battaglia Emilio — L'evoluzione del gametofito maschile dalle Gimnosperme alle Angiosperme sulla base di recenti osservazioni in *Gnetum*. (Caryologia, XI: 217-228, 2 figure nel testo, 1958).

244. Battaglia Emilio — Il cariotipo di *Scilla hyacinthoides L.* (Liliaceae). (Caryologia, XI: 261-272, Tav. XX-XXI e 6 figure nel testo, 1959).

245. Battaglia Emilio — L'abolizione del tipo embriologico *Scilla* e la creazione dei nuovi tipi *Endymion* ed *Allium*. (Caryologia, XI: 247-252, 1 figura nel testo, 1958).

246. Battaglia Emilio — Osservazioni critiche sul tipo di sviluppo del gametofito femminile attribuito a *Scilla hyacinthoides* L. (Liliaceae). (Caryologia, XI: 253-258, 1958).

247. Battaglia Emilio — Mutazioni cromosomiche e formule relative. (Caryologia, XI: 259-260, 1958).

248. Battaglia Emilio and Edward Feelev — The embryo sac of *Scilla pratensis* Waldst. et Kit. (Liliaceae). (Caryologia, XI: 407-414, with 13 text-figures, 1959).

249. Battaglia Emilio — Sex determination by cytological examination of salivary and urinary sediments. (Caryologia, XII: 146-150, Plate XI, 1959).

250. Battaglia Emilio e Cenni Bruno — Contributo alla cariologia di *Bos taurus*. (Caryologia, XII: 162-172, Tavole XII-XIV, 1959).

251. Bozzini Alessandro — Revisione cito-sistematica del genere *Asparagus* L. I: Le specie di *Asparagus* della flora italiana e chiave analitica per la loro determinazione. (Caryologia, XII: 199-264, Tavole XV-XVII, 1959).

252. Battaglia Emilio — A 30 minutes procedure for staining blood and bone marrow smears by the Feulgen method. (Caryologia, XII: 186-187, 1959).

253. Chiarugi Alberto — L'evoluzione del sistema genetico a livello sopraspecifico. (Accademia Nazionale dei Lincei: « Problemi di Scienza e Cultura, Quaderno n. 47 » 237-271, 1960).

254. Milossky Alessandra — Ricerche sull'azione citogenetica delle sostanze chinoliniche (Caryologia, XII: 439-481, Tavole XXXI-XL e 2 figure nel testo, 1960).

255. Chiarugi Alberto — Tavole cromosomiche delle Pteridophyta. (Caryologia, 13 » 27-150, 1960).

256. Maugini Elena — Ricerche sulla citogeografia e sulla tassonomia dell'*Urginea maritima* Bak. (Caryologia, **13**: 151-163, con 1 figura nel testo, 1960).

257. Fabbri Fernando — Contributo per l'interpretazione della persistenza nucleolare durante la mitosi in *Psilotum nudum* (*L.*) Beauv. (Caryologia, **13**: 297-337, Tavole XXXIX-XLII e 8 figure nel testo, 1960).

NOTICE TO AUTHORS

CARYOLOGIA is a periodical devoted to the publication of original research plant and animal cytology, cytosystematics and genetics. One volume, of about 50-500 pages, is issued yearly and it consists of three numbers (*Subscription rate: t. 4800 a year*).

Papers, subscriptions, correspondence with reference to editorial matters ould be addressed to the Associate Director, Dr. Fernando Fabbri, "Ca-ologia", Via Lamarmora, 4 - Firenze, Italy.

MANUSCRIPT - Contributions in Italian, English and French are accepted; ey should be typewritten and in complete and final form for publication.

The name of the Authors referred to in the Manuscript should be written in pitals and should be followed by the year, in parenthesis, in which the paper as published. Papers referred to in the Manuscript should be listed on a separate ge, which follows the main text and before the explanation of the plates. En-ish and Italian summaries should complete the paper.

LITERATURE CITED - The references should be arranged in alphabetical order cording to the following style for punctuation and order of listing:

RACHET J., 1957. — Biochemical cytology. Academic Press, New York.

HIARUGI A., 1933a. — La cariologia e le sue applicazioni a problemi di botanica. Atti Soc. Ital. Progr. Sci., 3: 55-92.

-, 1933b. — Osservazioni cariologiche e sistematiche sui generi Kernera e Rhizobotrya (Cruciferae-Thlaspidinae). Nuovo Giorn. Bot. Ital., n. s., 40: 63-75.

TABLES AND FIGURES - In preparing tables and figures for publication e size of the printed page, mm. 120 × 180, should be kept in mind. The figure gends should be submitted on a separate page. Photographs for plates should e carefully mounted on cardboard and the progressive number placed at the wer right angle of each photograph.

PROOFS - The first proofs submitted are sent for corrections to the Author, ho should limit to the maximum any alteration of the text. If necessary, the ditorial Secretary will forward also the second proofs, in which only the printer's rors should be corrected.

REPRINTS - The Authors will be furnished, free of charge, with 50 re-ints without covers. Additional reprints may be obtained at cost and the order ould be written on the proofs.

Authors are responsible for the content and style of their contributions.

Dr. FERNANDO FABBRI *Condirettore responsabile* - Industria Tipografica Fiorentina - Firenze
Decreto del Tribunale di Firenze n. 478 in data 13 luglio 1951

CARYOLOGIA, Vol. 13, n. 2, 1960

INDICE

D'Amato Francesco — Cyto-histological investigations of antimitotic substances and their effects on patterns of differentiation pp. 339-
Gerola F. M., Cristofori F. e Dassù G. — Ricerche sulle infrastrutture delle cellule del mesofillo fogliare di piante sane e virosate di Tabacco (*Nicotiana tabacum*). A: piante sane (con Tavola XLIV e una figura nel testo) . . . . . » 352-
Gerola F. M., Cristofori F. e Dassù G. — Ricerche sulle infrastrutture delle cellule del mesofillo fogliare di piante sane e virosate di Tabacco (*Nicotiana tabacum*). B: piante virosate (con Tavole XLV-XLIX) . . . . . » 367-
Khoshoo T. N. and Raj B. — Seed development following the reciprocal matings between the diploid and the autotetraploid strains of *Sisymbrium irio* var. *subtorulosum* (with 26 text-figures) . . . . . » 379-
Gerola F. M. e Dassù G. — Variazioni delle infrastrutture dei cloroplasti di Tabacco (*Nicotiana tabacum*) durante l'imbianchimento sperimentalmente indotto delle foglie e il loro successivo rinverdimento (con Tavole L-LIII) . . . . . » 398-
Sen N. K. and Marimuthu K. M. — Colchiploids of *Dolichos Lablab* L. (with Plate LIV) . . . . . » 411-
Messeri Enrico — Ricerca sperimentale sul comportamento fenotipico degli epilettici verso il test PTC (con una figura nel testo) » 430-
Quattrini Diletto — Osservazioni su un passaggio di ribonucleoproteine dal citoplasma al nucleo e su un gruppo di neuroni secernenti nel sistema nervoso centrale dei Molluschi Gasteropodi (con Tavole LV-LX) . . . . . » 444-
Messeri Enrico — Considerazioni geografiche sulle frequenze dei gruppi sanguigni ABO in alcune tribù somale (con 7 figure nel testo) . . . . . » 469-
Sharma A. K. and Chatterji T. — Chromosome studies of some members of Polygonaceae (with Plate LXI-LXIII) . . . » 486-
Stefani Renzo — L'azione della colchicina sulle cellule dell'epitelio follicolare ovarico degli Embiotteri (con Tavola LXIV) . . » 507-
Malik C. P. and Tandon S. L. — Meiotic abnormalities and failure of spindle mechanism in *Suaeda fruticosa* Forsk. (with Plate LXV-LXVI) . . . . . » 516-
Salvi Florido — Analisi della variabilità genetica del peso vivo alle età di sei e dodici mesi nei vitelli di razza Chianina (con 3 figure nel testo) . . . . . » 523-
Messeri Enrico — Considerazioni ecologiche sul colore degli occhi fra i Somali (con Tavola LXVII e 10 figure nel testo) . . » 544-
Pubblicazioni del « Centro di Studio per la Citogenetica Vegetale del Consiglio Nazionale delle Ricerche », diretto dal Prof. Alberto Chiarugi: 226-257 . . . . . » 556-

(Pubblicato il 30 luglio 1960)